



Instituto Politécnico do Porto  
Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto

Liliana Maria Pinho Correia

# **Modulação do estado redox em bactérias por quinoxalinas**

Mestrado em Bioquímica em Saúde  
Ramo em Biotecnologia

Outubro, 2014





Instituto Politécnico do Porto  
Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto

Liliana Maria Pinho Correia

# **Modulação do estado redox em bactérias por quinoxalinas bacteriana**

Mestrado em Bioquímica em Saúde  
Ramo em Biotecnologia

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto para  
cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia  
Bioquímica em Saúde, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Mónica  
Vieira da área científica das Ciências Químicas e das Biomoléculas.

Outubro, 2014



*“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”*

Marie Curie



## Agradecimentos

À Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, em especial a Área Científica das Ciências Químicas e das Biomoléculas pelo acolhimento neste mestrado.

À professora Doutora Mónica Vieira, ao professor Doutor Ruben Fernandes e ao professor Doutor Ricardo pela transmissão de conhecimentos, compreensão, paciência em me explicar o “ABC” da bioquímica e orientação ao longo do mestrado.

À professora Cláudia Pereira, que foi imprescindível para a realização desta tese com a transmissão dos seus conhecimentos, com a sua paciência e ajuda incondicional que sempre me disponibilizou. Muito Obrigada.

Ao professor Pedro Coelho pela disponibilidade e apoio sempre que o solicitei.

A todos os meus amigos aos quais tenho de agradecer especificamente. À Paula, que me acolheu desde o 1º dia e sempre se disponibilizou para me ajudar. Muito obrigada pela tua força inicial que foi fulcral para chegar até aqui e pelo teu forte apoio constante. À Li e Larissa, pela amizade e cumplicidade, pelas imensas horas extras nos trabalhos e no laboratório e pela boa disposição! Ao Patrick, pelo grande apoio para o início da tese. À Carla, muito obrigada por ter estado sempre disponível quando mais precisei. À Rita, Melissa, Inês, ao Nuno e Daniel pelo companheirismo.

Ao Diogo, por todo o apoio, pela paciência e presença, por tudo. Um profundo obrigada.

Ao meu irmão, obrigada pelo incentivo e auxílio e por nunca me ter deixado pensar em desistir do caminho que anseio continuar.

Aos meus pais que fizeram tantos sacrifícios para chegar até aqui e, mesmo assim, me apoiaram sempre. O meu maior e distinto agradecimento pelo carinho, compreensão e formação profissional e pessoal que me transmitiram.





## Resumo

As quinoxalinas são compostos heterocíclicos que têm, entre outras, capacidades antimicrobianas, inclusive contra bactérias resistentes aos antimicrobianos convencionais. Os mecanismos pelos quais estes compostos exercem a sua atividade ainda não está completamente esclarecido. O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito redox em sinergismo/antagonismo com as quinoxalinas em modelos de bactérias com e sem resistências a antimicrobianos.

No que se refere aos compostos foram utilizados a quinoxalina 1,4-dióxido (QNX), 2-metil-3-benzilquinoxalina-1,4-dióxido (2M3BQNX), 2-metilquinoxalina-1,4-dióxido (2MQNX) e a 2-amino-3-cianoquinoxalina-1,4-dióxido (2A3CQNX). Quanto aos modelos procariotas, foram utilizados a *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Methicillin-resistent *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Escherichia coli* TEM 201 e *Escherichia coli* TEM 180.

Nos compostos químicos em que se verificou a Concentração Mínima Inibitória (CMI), realizou-se o estudo do comportamento do crescimento bacteriano. Relativamente ao estado redox, foi avaliado para cada estirpe sensível, através do rácio GSH/GSSG, nas doses inibitórias e não inibitórias de cada composto.

Os resultados apresentam que todos os compostos testados, à exceção do 2M3BQNX, têm atividade antimicrobiana na maioria das estirpes, excetuando a *E. faecalis* e a *S. saprophyticus*. Os rácios GSH/GSSG apontam para o efeito oxidante em *K. pneumoniae* e *S. enterica* e antioxidante na *E. aerogenes*.

A conclusão do estudo sugere que os compostos apresentam elevada capacidade antibacteriana e influência no equilíbrio redox das bactérias, podendo contribuir para o esclarecimento do mecanismo de ação dos derivados das quinoxalinas 1-4 dióxido, nas bactérias.

**Palavra-chave:** Quinoxalinas N,N-dióxido, métodos de suscetibilidade antimicrobiana, atividade antimicrobiana, curvas de crescimento e *stress* oxidativo.



## Abstract

The quinoxalines are heterocyclic compounds having antimicrobial capacity even against bacteria resistant to the conventional antibiotics. The mechanisms by which these compounds exert their activity is not completely understood. The aim of this study is to evaluate the redox effect in synergism / antagonism with quinoxalines in models of bacteria with and without resistance to antimicrobials.

As regard the compounds were used the quinoxaline 1,4-dioxide (QNX), 2-methyl-3-benzilquinoxalina-1,4-dioxide (2M3BQNX), 2-methylquinoxaline-1,4-dioxide (2MQNX) and 2-amino-3-cianoquinoxalina-1,4-dioxide (2A3CQNX). As regards prokaryotic models were used *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Escherichia coli* TEM 201 and *Escherichia coli* TEM 180.

In chemical compounds which saw the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was held to study the behavior of bacterial growth. For the redox state was evaluated for each sensitive strain, using the GSH / GSSG ratio, the inhibiting and non-inhibiting dose of each compound.

The results show that all compounds tested, except for 2M3BQNX have antimicrobial activity in most strains, except for *E. faecalis* and *S. saprophyticus*. The GSH/GSSG ratios point to the oxidizing effect on *K. pneumoniae* and *S. enterica* in *E. aerogenes* and antioxidant.

The conclusion suggests that the compounds have high antibacterial ability and influence on the redox balance of bacteria and may contribute to the elucidation of the mechanism of action of derivatives of quinoxalines 1-4 dioxide in bacteria.

**Keyword:** Quinoxalines N, N-dioxide, methods of antimicrobial susceptibility, antimicrobial activity, growth curves and oxidative stress.



## Índice geral

<b>CAPÍTULO I: ESTADO DE ARTE.....</b>	<b>1</b>
1. Introdução .....	3
2. Antimicrobianos .....	3
2.1. Classificação dos antibióticos .....	6
2.1.1. Interações dos antibióticos: Sinergismo, antagonismo e indiferença .....	7
2.2. Famílias de antibióticos .....	7
2.3. Tolerância aos antibióticos .....	14
2.3.1. Persistência bacteriana .....	14
2.4. Resistência aos antibióticos .....	15
2.4.1. Tipos de resistências .....	16
2.4.2. Bioquímica dos mecanismos de resistências aos antibióticos .....	18
2.4.3. Mecanismos de multirresistência a antibióticos .....	19
2.5. Estirpes Bacterianas.....	22
2.5.1. <i>Escherichia coli</i> .....	23
2.5.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	23
2.5.3. <i>Enterococcus faecalis</i> .....	24
2.5.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	25
2.5.5. <i>Staphylococcus saprophyticus</i> .....	25
2.5.6. <i>Salmonella enterica</i> .....	25
2.5.7. <i>Enterobacter cloacae</i> .....	26
2.5.8. <i>Enterobacter aerogenes</i> .....	26
3. Stress oxidativo .....	27
3.1. Fatores de stress oxidativo .....	28
3.1.1. Fontes não enzimáticas.....	28
3.1.2. Fontes enzimáticas .....	29
3.2. Mecanismos de regulação do stress oxidativo.....	29
3.2.1. Antioxidantes enzimáticos .....	29
3.2.2. Antioxidantes não enzimáticos.....	31
3.3. Relação entre o stress oxidativo e a ação bacteriana.....	32
4. Quinoxalinas e seus derivados.....	33
4.1. Derivados da quinoxalina 1-4 dióxido .....	34

4.2. Atividade antimicrobiana das quinoxalinas e seus derivados.....	34
5. Objetivos.....	36
5.1. Objetivo geral do presente estudo:.....	36
5.1.2. Objetivos específicos: .....	36
<b>CAPÍTULO II: MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
6. Materiais e métodos .....	39
6.1. Concentrações da Quinoxalina- <i>N,N</i> -dióxido e derivados .....	39
6.2. Estirpes bacterianas.....	39
6.3. Método para o Teste de Suscetibilidade antimicrobiana .....	39
6.4. Avaliação do crescimento bacteriano sujeito ao composto .....	41
6.5. Análise por HPLC .....	41
6.5.1. Análise das Glutathionas por HPLC.....	41
No método de HPLC, fez-se uma análise do <i>stress</i> oxidativo em células bacterianas, sujeitas à presença de quinoxalinas, nas concentrações de MIC, menor que MIC e sem composto. ....	41
<b>CAPÍTULO III: RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
7. Atividade antimicrobiana .....	44
7.1. Determinação de CMI.....	44
7.2. Curvas de crescimento.....	45
8. Atividade antimicrobiana do composto QNX.....	45
8.1. Curvas de crescimento.....	45
9. Atividade antimicrobiana do composto 2MQNX .....	48
9.1. Determinação da CMI.....	48
9.2. Curvas de crescimento.....	49
8.2.1. <i>K. pneumoniae</i> .....	49
9.2.2. <i>E. aerogenes</i> .....	49
10. Atividade antimicrobiana do composto 2A3CQNX .....	53
10.1. Determinação da CMI.....	53
10.2. Curvas de crescimento .....	53
11. Atividade antimicrobiana do composto 2M3BQNX .....	55
12. Análise do rácio das glutathionas.....	57
12.1. Variação do estado oxidativo ao longo do tempo.....	57
<b>CAPÍTULO IV: DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
13. Discussão/Conclusão .....	62

14. Perspetivas futuras .....	65
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>

## Índice de tabelas

Tabela 1: Atividade dos antibióticos com uso mais frequente.....	6
Tabela 2: Principais mecanismos de ação e resistência dos antibióticos.....	17
Tabela 3: Derivados de quinoxalinas em estudo.....	34
Tabela 4: Atividade antimicrobiana de derivados de quinoxalinas.....	35
Tabela 5: Método para o Teste de Suscetibilidade antimicrobiana.....	40
Tabela 6: Concentração mínima inibitória do composto QNX para as estirpes em estudo.....	44
Tabela 7. Comparação dos rácios de glutationas da <i>E. aerogenes</i> na ausência e presença de derivados das quinoxalinas.....	58
Tabela 8. Comparação dos rácios de glutationas da <i>S. enterica</i> na ausência e presença de derivados das quinoxalinas.....	59
Tabela 9. Comparação dos rácios de glutationas da <i>K. pneumoniae</i> .....	60

## Índice de figuras

Figura 1: Quinoxalina. ....	3
Figura 2: Relação entre as infeções e o desenvolvimento de antimicrobiano.....	5
Figura 3: Antibióticos representantes das principais classes de antibióticos de origem natural. ....	9
Figura 4: Antibióticos representantes das principais classes de antibióticos de origem natural.....	10
Figura 5: Mecanismos de MDR.....	20
Figura 6: Estrutura da parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	22
Figura7: Origem das espécies reativas de oxigénio (ROS) .....	28

Figura 8: O <i>stress</i> oxidativo e a disfunção na mitocôndria. ....	30
Figura 9: Representação da variação ao longo do tempo, dos rácios GSH/GSSG da <i>K pneumoniae</i> , <i>S. enterica</i> e <i>E. aerogenes</i> na presença dos compostos QNX, 2MQNX e 2A3CQNX. ....	57

##  ndice de gráficos

Gráfico 1. Evolu�o do crescimento da <i>E. cloacae</i> , ao longo do tempo, até às 24horas, na ausência e na presença do composto QNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentra�o mínima inibitória): 0,2mg/mL; CMI (concentra�o mínima inibitória): 0,4mg/mL. ....	45
---	----

Gráfico 2. Evolu�o do crescimento da <i>E. aerogenes</i> , ao longo do tempo, até às 24horas, na ausência e na presença do composto QNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentra�o mínima inibitória): 0,5mg/mL; CMI (concentra�o mínima inibitória): 0,7mg/mL. ....	46
---	----

Gráfico 3. Evolu�o do crescimento da <i>K.pneumoniae</i> , ao longo do tempo, até às 24horas, na ausência e na presença do composto QNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentra�o mínima inibitória): 0,5mg/mL; CMI (concentra�o mínima inibitória): 0,7mg/mL. ....	47
---	----

Gráfico 4. Evolu�o do crescimento da <i>S. enterica</i> , ao longo do tempo, até às 24horas, na ausência e na presença do composto QNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentra�o mínima inibitória): 0,1mg/mL; CMI (concentra�o mínima inibitória): 0,3mg/mL. ....	48
--	----

Gráfico 5. Evolu�o do crescimento da <i>K. pneumoniae</i> , ao longo do tempo, até às 24horas, na ausência e na presença do composto 2MQNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentra�o mínima inibitória): 0,9mg/mL; CMI (concentra�o mínima inibitória): 1mg/mL ....	50
---	----



Gráfico 6. Evolução do crescimento da *E.aerogenes*, ao longo do tempo, até às 24horas, na ausência e na presença do composto 2MQNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentração mínima inibitória): 0,9mg/mL; CMI (concentração mínima inibitória): 1mg/mL .....50

Gráfico 7. Evolução do crescimento da *S. enterica*, ao longo do tempo, até às 24horas, na ausência e na presença do composto 2MQNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentração mínima inibitória): 0,4mg/mL; CMI (concentração mínima inibitória): 0,3mg/mL. ....50

Gráfico 8. Evolução do crescimento da *E.coli* Tem 201, ao longo do tempo, até às 24horas, na ausência e na presença do composto 2MQNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentração mínima inibitória): 1,2 mg/mL; CMI (concentração mínima inibitória): 1,4 mg/mL .....51

Gráfico 9. Evolução do crescimento da *E. coli* Tem 180, ao longo do tempo, até às 24horas, na ausência e na presença do composto 2MQNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentração mínima inibitória): 1,5mg/mL; CMI (concentração mínima inibitória): 1,7mg/mL. ....52

Gráfico 10. Evolução do crescimento da MRSA, ao longo do tempo, até às 24horas, na ausência e na presença do composto 2MQNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentração mínima inibitória): 1,4 mg/mL; CMI (concentração mínima inibitória): 1,7mg/mL. ....52

Gráfico 11. Evolução do crescimento da *K. pneumoniae*, ao longo do tempo, até às 24horas, na ausência e na presença do composto 2A3CQNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentração mínima inibitória): 0,3mg/mL; CMI (concentração mínima inibitória): 0,4mg/mL. ....54

Gráfico 12. Evolução do crescimento da *S.enterica*, ao longo do tempo, até às 24horas, na ausência e na presença do composto 2A3CQNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentração mínima inibitória): 0,9mg/mL; CMI (concentração mínima inibitória): 1mg/mL .....54

Gráfico 13. Evolução do crescimento da *S.aureus*, ao longo do tempo, até às 24 horas, na ausência e na presença do composto 2A3CQNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentração mínima inibitória): 1,1 mg/mL; CMI (concentração mínima inibitória): 1,4 mg/mL .....55

## Índice de abreviaturas e acrónimos

AAC	Acetiltransferase de aminoglicosídeo
APH	Fosforil-transferase de aminoglicosídeo
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CMI	Concentração Mínima Inibitória
D-Ala-D-Ala	D-Alanina-D-Alanina
ESBL	$\beta$ -lactamases de espectro estendido
EUA	Estados Unidos da América
FADH <sub>2</sub>	Flavina-adenina-dinucleótido
GCS	Sintetase de glutamylcisteína
GP	Peroxidase da glutathione
GR	Redutase da glutathione
GS	Sintetase da glutathione
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione dissulfureto/glutathione oxidada
GST	Glutathione-S-transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogénio
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
ITU	Infeções do trato urinário
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
Mn-SOD	Dismutase do superóxido mangânico
MRSA	<i>S. aureus</i> resistentes à meticilina
MRSA – AC	<i>S. aureus</i> resistentes à meticilina associados à comunidade

MRSA – AH	<i>S. aureus</i> resistentes à meticilina associados ao hospital
MRSA – AL	<i>S. aureus</i> resistentes à meticilina associados à pecuária
NADH	Nucleótido de nicotinamida-adenina
NADPH	Dinucleótido fosfato nicotinamida-adenina
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical superóxido
OMS	Organização Mundial de Saúde
PABA	Ácido paraminobenzóico
ROS	Espécies reativas de hidrogénio
SOD	Dismutase do superóxido
TFA	Ácido trifluoroacético
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptone Soy Broth</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

# **CAPÍTULO I:**

## **Estado de arte**



## 1. Introdução

As quinoxalinas, consideradas também benzopirazinas, são compostas por um anel heterocíclico de benzeno e um anel de pirazinas. Os heterocíclicos são compostos orgânicos cíclicos, em que os elementos de N, O ou S substituem um ou mais dos átomos de carbono do anel<sup>1,2</sup>. No caso das quinoxalinas, o N é o substituto. A Quinoxalina apresentada é um pó branco cristalino com um peso molecular de 130,1466400 e a sua fórmula molecular é C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub> (figura 1) <sup>3</sup>.

O anel da quinoxalina faz parte de vários antibióticos – Levomicina, Equinomicina e Actinoleitina – os quais inibem várias bactérias Gram-positivas <sup>4</sup>. Desta forma, tornou-se crucial utilizá-la como base e perceber como os seus derivados atuam. Vários estudos apontam que tendo como esqueleto de base a quinoxalina é possível um diverso número de compostos heterocíclicos com propriedades biológicas favoráveis do ponto de vista da química médica devido à sua atividade biológica antimicrobiana<sup>1,5-7</sup>, antiviral <sup>7,8</sup>, anti-tubercular <sup>9-12</sup>, anti-helmíntica <sup>13</sup>, anti-tumoral <sup>14-16</sup>, anti-arteroesclerótica <sup>17</sup>, anti-obesidade<sup>18</sup> e anti-depressiva <sup>19</sup>, entre outras atividades farmacológicas.

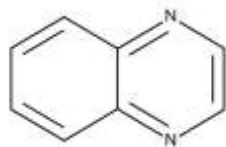


Figura 1: Quinoxalina.

## 2. Antimicrobianos

Os antimicrobianos podem ser classificados, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), como qualquer substância natural, semi-sintética ou sintética que a baixas concentrações mata ou inibe o crescimento de micro-organismos, o que causa baixas ou nenhuma lesões fisiológicas ao hospedeiro<sup>20</sup>. Quanto aos antibióticos, estes são usados para tratar infecções causadas por bactérias e fungos, em pessoas e animais<sup>21,22</sup>. Os antibióticos serão os antimicrobianos referidos e aprofundados ao longo do presente estudo.

Apesar da penicilina ter sido descoberta em 1928 por Alexander Fleming, os primeiros antibióticos usados com eficácia foram as sulfonamidas<sup>23</sup>. No entanto, as infecções bacterianas só diminuíram de forma significativa quando a penicilina tornou-se disponível

para uso no início dos anos 1940, através de Chain e Florey que comprovaram a sua eficácia<sup>24</sup>. Contudo, o entusiasmo da cura das doenças infecciosas foi de curta duração. Num curto período de tempo, as bactérias começaram a demonstrar mecanismos de resistência<sup>25-28</sup>. Na figura 2, é apresentado o desenvolvimento dos antibióticos e as resistências bacterianas, ao longo do tempo.





Figura 2: Relação entre as infecções e o desenvolvimento de antimicrobiano. (a) Compostos testados em modelo animal (adaptado de Butler et al., 2013, Tang et al., 2014 e Daniel et al, 2014<sup>28–30</sup>).

## 2.1. Classificação dos antibióticos

Os antimicrobianos podem ser classificados de várias formas, mas tendo como base quatro aspectos principais: as classes dos microrganismos, o espectro da atividade antibacteriana, a atividade bactericida ou bacteriostática e a atividade dos antibióticos tendo em conta a relação com a sua concentração-tempo. Quanto às suas classes e à sua atividade, os antibióticos podem ser divididos em espectro estreito, quando inibem apenas bactérias e Gram-positivas ou Gram-negativas, ou de espectro alargado se inibem também clamídias, micoplasma ou rickettsias, tanto Gram-negativas como Gram-positivas<sup>31</sup>. O espectro de atividade dos antibióticos mais comuns é apresentado na tabela 1. A ação bacteriostática impede o crescimento das bactérias, mantendo o mesmo na fase estacionária ao passo que a ação bactericida leva à morte celular, ao atuar em processos vitais<sup>32</sup>. No que respeita à farmacocinética do antibiótico, a concentração sérica ao longo do tempo e a área sob a curva de concentração tempo, quando integrada com os valores da concentração

Tabela 1: Atividade dos antibióticos com uso mais frequente.

Classes de antibióticos						
Antibióticos	Bactérias	Fungos	Micoplasma	Rickettsias	Clamídias	Protozoários
Aminoglicosídeos	+	-	+	-	-	-
$\beta$ -lactâmicos	+	-	-	-	-	-
Clorafenicol	+	-	+	+	+	-
Fluoroquinolonas	+	-	+	+	+	-
Glicilciclinas	+		+	+	+	+/-
Lincosamidas	+	-	+	-	-	+/-
Macrólidos	+	-	+	-	+	+/-
Oxazolidonas	+	-	+	-	-	-
Pleuromutilinas	+	-	+	-	+	-
Tetraciclinas	+	-	+	+	+	+/-
Sulfonamidas	+	-	+	-	+	+
Streptograminas	+	-	+	-	+	+/-
Trimetropim	+	-	-	-	-	+

mínima inibitória (CMI), coadjuva na previsão da erradicação das bactérias e no seu posterior sucesso clínico. Quanto às propriedades farmacodinâmicas, estas relacionam a concentração do antibiótico com a sua atividade contra os patógenos<sup>33</sup>.

### **2.1.1. Interações dos antibióticos: Sinergismo, antagonismo e indiferença**

Os mecanismos de ação dos antibióticos indicam as probabilidades do que poderá acontecer quando há a combinação entre si. Comumente, a combinação de vários antibióticos permite aumentar o espectro de ação em tratamentos de doentes em estado crítico de infecção. Desta forma, as interações de antibióticos classificam-se como indiferentes quando os efeitos dos mesmos são iguais se usados separadamente, sinérgicas se os efeitos são potencialmente melhores quando utilizados em conjunto, e antagonistas se os efeitos são diminuídos comparativamente ao seu uso independente<sup>18,34</sup>. O sinergismo envolve: inibição sequencial da síntese da membrana celular, a inibição da inativação de enzimas e prevenção de resistências<sup>35-39</sup>. O antagonismo envolve: inibição da atividade bactericida, competição dos antibióticos por locais de ligação, inibição dos mecanismos de permeabilidade da célula e indução de  $\beta$ -lactamases por  $\beta$ -lactâmicos<sup>40</sup>. A imprevisibilidade das interações dos antibióticos, que está também correlacionada com a natureza das espécies bacterianas em causa, fazem com que os efeitos de algumas combinações sejam previsivelmente perigosas, pois a mesma combinação pode ter efeitos de sinergismo e antagonismo consoante a espécie.

## **2.2. Famílias de antibióticos**

Os antibióticos são compostos que se subdividem em naturais, semi-sintéticos e sintéticos, os quais são capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias.

### 2.2.1. Principais classes de antibióticos

Os antibióticos de origem natural e seus derivados semi-sintéticos englobam a maior parte dos antibióticos em uso clínico e categorizaram-se em  $\beta$ -lactâmicos (como as Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenemos e Monobactamos), as Tetraciclinas, Aminoglicosídeos, Macrólidos, Glicopéptidos (como a Vancomicina, Teicoplanina), entre outros. Os antibióticos de origem sintética categorizam-se em Sulfonamidas, Fluoroquinolonas e Oxazolidinonas<sup>29,41</sup>. Na figura 3 são apresentados os principais antibióticos de origem natural e na figura 4 os antibióticos de origem sintética.

#### 2.2.1. $\beta$ -lactâmicos

Os  $\beta$ -lactâmicos são um grupo de origem natural ou semi-sintética com ação bactericida lenta, independentes da concentração plasmática e possuem um amplo espectro terapêutico, o qual inclui bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. No entanto, não têm atividade terapêutica contra os micoplasmas, pois estes não têm parede celular, e nem sobre as bactérias intracelulares, como as Clamídias e Riquetésias<sup>31,42</sup>.

Podem-se classificar em quatro grupos diferentes: Penicilinas, Cefalosporinas, Monobactamos e Carbapenemos<sup>28</sup>. O seu mecanismo de ação passa pela atividade bactericida que inibe a síntese da parede celular bacteriana e, desta forma, induzem um efeito autolítico<sup>32</sup>. A destruição da parede celular é a consequência da inibição da síntese do peptidoglicano, através da inibição da transpeptidação, última etapa da síntese da parede celular<sup>43,44</sup>. Para que os  $\beta$ -lactâmicos possam ter atividade é necessário que a bactéria esteja em fase de multiplicação, visto que é quando sintetiza a parede celular. Os  $\beta$ -lactâmicos também atuam através da ativação de uma autolisina bacteriana endógena que destrói o peptidoglicano das bactérias. Contudo, as bactérias que não têm autolisina são tolerantes visto que são inibidas mas não destruídas<sup>45</sup>.

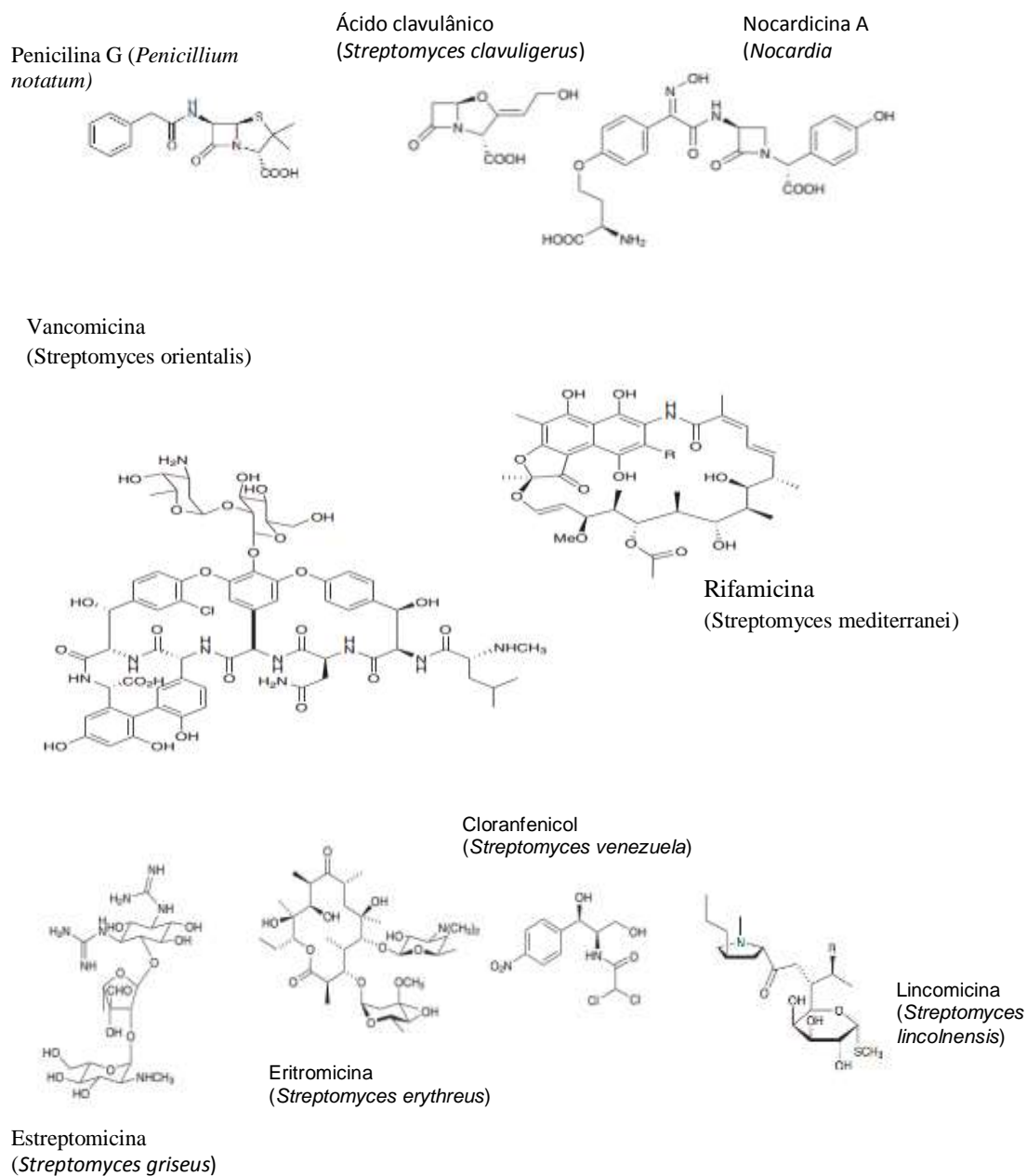


Figura 3: Antibióticos representantes das principais classes de antibióticos de origem natural.

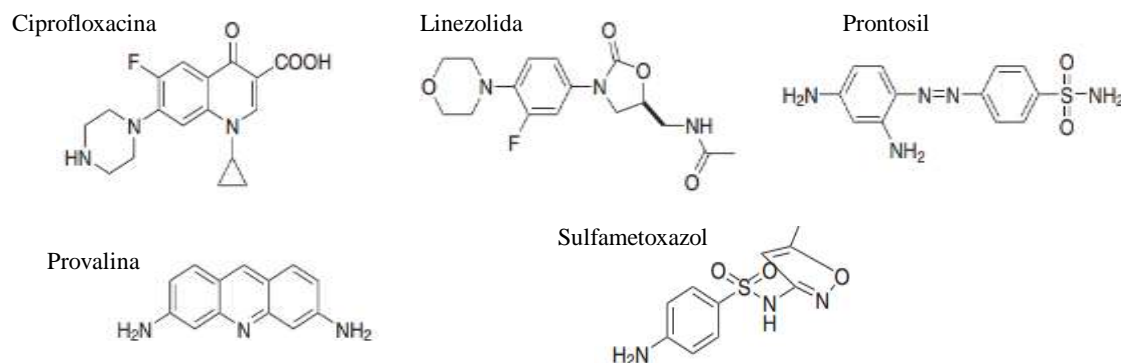


Figura 4: Antibióticos representantes dos principais antibióticos sintéticos.

#### 2.2.1.1. Penicilinas

As Penicilinas são constituídas por um núcleo de ácido 6-aminopenicilânico, o qual consiste num anel  $\beta$ -lactâmico e um anel tiazolidínico. As Penicilinas de origem natural são produzidas por diferentes espécies de *Penicillium spp.* Estas inibem o crescimento das bactérias suscetíveis através da inibição da transpeptidase que catalisa o passo final da síntese da parede celular devido à sua estrutura análoga ao Acil-D-alanil-D-alanina<sup>46-48</sup>. As Penicilinas diferem devido a substituições na posição 6 ou 7 do anel através das mudanças feitas na cadeia lateral, o que leva a mudanças antibióticas. Portanto, a produção de derivados semi-sintéticos do ácido 6-aminopenicilânico permite antibióticos com maior resistência a  $\beta$ -lactamases e maior capacidade de penetração nas bactérias Gram-negativas<sup>49,50</sup>. Como pertencem aos  $\beta$ -lactâmicos, a sua penetração intracelular é reduzida, tendo um máximo de concentração plasmática de 50%<sup>28</sup>.

#### 2.2.2.2. Cefalosporinas

As Cefalosporinas são de origem animal e derivam da fermentação da *Cephalosporium acremonium*. Todas as Cefalosporinas, excluindo a Cefamicina, são constituídas por um núcleo de ácido 7-aminocefalosporâmico, modificações na posição 7 que alteram a atividade antibacteriana, e substituições na posição 3 que alteram a farmacocinética e o metabolismo do antibiótico. O núcleo básico da cefamicina difere

ligeiramente do ácido 7-aminocefalosporânico: tem um grupo 7- $\alpha$ -metoxi o qual aumenta significativamente a estabilidade para a hidrólise<sup>51,52</sup>. As Cefalosporinas são divididas em 4 gerações: as Cefalosporinas de primeira geração são ativas contra cocos Gram-positivos e as restantes têm maior atividades frente a bacilos Gram-negativos<sup>41</sup>.

#### **2.2.2.3. Monobactamos**

Para uso clínico, apenas o Aztreonam é considerado devido à sua atividade contra as bactérias Gram-negativas aeróbias e anaeróbias facultativas. No entanto, não tem atividade contra Gram-positivos e bactérias anaeróbias<sup>53</sup>. Como todos os membros dos  $\beta$ -lactâmicos, os Monobactamos interferem na síntese da parede celular, neste caso através da formação de filamentos. As proteínas de ligação à penicilina indicam uma elevada afinidade com proteínas do peptidoglicano de bactérias aeróbias Gram-negativas, extinguindo-as<sup>41,53</sup>.

#### **2.2.2.4. Carbapenemos**

Os Carbapenemos são a classe de  $\beta$ -lactâmicos que têm maior espectro de atividade dentro deste grupo de antibióticos. A sua atividade bactericida estende-se a cocos Gram-positivos, excepto a estafilococos resistentes a Meticilinas e a  $\beta$ -lactâmicos. É também ativo contra a maioria das enterobactérias<sup>54</sup>. Os Carbapenemos são divididos em “velhos” Carbapenemos que estão sujeitos à degradação do DHP-1 nos tubos renais e os danifica e requer co-administração do inibidor de DHP-1, e em “novos” Carbapenemos que são estáveis na degradação do DHP-1 porque tem a presença de um resíduo 1- $\beta$  metil<sup>55</sup>. Atuam pela inibição da síntese da parede celular bacteriana pela inativação das PLPs e são estáveis para a maioria das  $\beta$ -lactamases AmpC incluindo ESBLs<sup>55,56</sup>.

#### **2.2.2.5. $\beta$ -lactâmicos associados a inibidores de $\beta$ -lactamases**

Os inibidores de  $\beta$ -lactamases têm propriedades autodestrutivas visto que quando se unem com as enzimas, que produzem  $\beta$ -lactamases, destroem-nas mas também são

destruídos por elas. Existem três inibidores em uso clínico: ácido Clavulânico, Sulbactam e Tazobactam. Estes, unidos com penicilinas ou cefalosporinas, recuperam a atividade antibacteriana inicial, ou seja, antes da produção das  $\beta$ -lactamases<sup>57,58</sup>. Atualmente, encontram-se em comercialização no mercado nacional duas associações: Amoxicilina com ácido Clavulânico e Piperacilina com Tazobactam. A associação dos antibióticos amoxicilina com ácido clavulânico permite aumentar a ação contra microrganismos que se estavam a tornar resistentes aos derivados da Penicilina<sup>59</sup>. Na segunda associação, piperacilina com o composto tazobactam, são estruturalmente semelhantes à penicilina, em que o Tazobactam sofre a ação das  $\beta$ -lactamases, deixando o antibiótico livre para atuar<sup>60</sup>.

#### **2.2.2.6. Glicopéptidos**

Os glicopéptidos atuam sobre a parede celular e incluem a vancomicina e a teicoplanina. Visto que têm vários tipos de mecanismos de ação torna menos possível o desenvolvimento de resistências<sup>28,61</sup>. Estes abrangem a inibição da síntese da segunda fase do peptidoglicano da parede celular através da formação de um complexo com a porção de D-alanina-D-alanina do precursor pentapeptídico<sup>43,62</sup>. Caracterizam-se também por causar danos e alterar a permeabilidade da membrana citoplasmática e a síntese de RNA. Desta forma, tem uma penetração intracelular muito baixa<sup>63</sup>.

#### **2.2.2.7. Aminoglicosídeos**

Os aminoglicosídeos são os mais utilizados para infecções nosocomiais causadas por bactérias aeróbias Gram-negativas. São definidos pela presença de dois ou mais açúcares por ligações N-glicosídeas a um anel aminociclitol<sup>64</sup>. Estes antibióticos unem-se de forma irreversível à subunidade 30s do ribossoma, interferindo na leitura do código genético que resulta no bloqueio da síntese proteica da bactéria<sup>65,66</sup>. Devido à sua estrutura polar, a entrada no interior das células é baixa mas aumenta quando administrada em combinação com  $\beta$ -lactâmicos e glicopéptidos pois estes inibem a síntese da parede bacteriana<sup>65</sup>.



#### **2.2.2.8. Macrólidos**

Os macrólidos são clinicamente importantes para tratar infecções causadas por bactérias Gram-positivas, tais como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*<sup>67,68</sup>. Classificam-se e diferenciam-se consoante o número de carbonos que possuem: 14 carbonos, eritromicina e claritromicina, 15 carbonos, azitromicina, e 16 carbonos, espiramicina. A sua ação passa por se unir à subunidade 50S de RNA em forma reversível, o que acontece através de pontes de hidrogénio entre diferentes radicais hidroxilo do macrólido e as bases de RNA, o que bloqueia a transpeptidação<sup>68</sup>.

#### **2.2.2.9. Tetraciclínas**

As tetraciclínas são um conjunto de antibióticos naturais e semi-sintéticos que derivam da *Streptomyces spp.*, com uma estrutura tetracíclica e atuam na síntese de proteínas bacterianas<sup>69</sup>. Têm ação na membrana externa das bactérias através de porinas por difusão passiva e atingem o citoplasma no qual se unem ao ribossoma, na subunidade 30S e inibem a síntese de proteínas visto que o RNAt não se consegue associar ao RNAm. A associação é reversível, o que explica o seu efeito bacteriostático<sup>69,70</sup>.

#### **2.2.2.10. Quinolonas/Fluoroquinolonas**

As quinolonas são derivados do ácido nalidíxico e foram descobertos, acidentalmente, em 1962 e são formadas por uma dupla estrutura de anilo<sup>71</sup>. As quinolonas atuam dentro da célula bacteriana no girase do ADN e na topoisomerase IV<sup>72</sup>. Quando atuam no girase do ADN a bactéria fica sensível à ação das quinolonas, se for Gram-negativa, mas se for Gram-positiva é mais sensível quando interatuam com a topoisomerase IV. Quando atuam com o girase do ADN a inibição ocorre mais rapidamente do que com a topoisomerase IV, o que leva as que as quinolonas conseguiram estabilizar complexos de ADN<sup>73</sup>.

As fluoroquinolonas são derivados das quinolonas com um fluor na posição 6 do anel da quinolona, o que aumenta o espectro para bacilos Gram-negativos e alguns cocos Gram-positivos<sup>74</sup>.

#### **2.2.2.11. Sulfonamidas**

As sulfonamidas possuem espectro alargado e são classificadas consoante a sua capacidade de absorção, excreção e ação. O seu mecanismo de ação é bacteriostático e baseia-se na inibição da síntese dos ácidos nucleicos bacterianos<sup>75</sup>. Todos os microrganismos sensíveis às sulfonamidas não são capazes de obter ácido fólico de forma exógena e, por isso, sintetizam-no na presença de ácido paraminobenzóico (PABA). As sulfonamidas tem uma estrutura semelhante ao PABA e, assim, vão agir como antimetabólicos, ou seja, as bactérias utilizam a sulfonamida no lugar do PABA e, consequentemente, o material genético bacteriano não se reproduz visto que o ácido fólico é essencial para a síntese de ácidos nucleicos bacterianos<sup>76,77</sup>.

### **2.3. Tolerância aos antibióticos**

A tolerância aos antimicrobianos define-se pela capacidade de uma bactéria ser sensível à concentração mínima inibitória (CMI) do antibiótico, porém apresenta-se com maior capacidade de sobreviver na presença da droga.

#### **2.3.1. Persistência bacteriana**

As células bacterianas persistentes foram inicialmente identificadas por Joseph Bigger em 1944, quando descobriu uma sub-população sobrevivente de *Staphylococcus spp* após o tratamento com penicilina<sup>78</sup>. A persistência acontece quando uma subpopulação bacteriana suscetível tem capacidade para sobreviver a doses letais de antibióticos no entanto, não é devida a modificação genética como a resistência, sendo caracterizada por variantes fenotípicas e não hereditárias, ou seja, as células bacterianas persistentes não são geneticamente resistentes ao antibiótico<sup>79,80</sup>. Os antibióticos são capazes de matar as estirpes sensíveis, no entanto são inativados pelas estirpes persistentes levando à tolerância da população. As persistentes constituem uma subfração de várias bactérias patogénicas e sobrevivem a elevadas concentrações de antibióticos, mesmo que os seus descendentes

apresentem sensibilidade ao mesmo antibiótico ou a vários antibióticos de uma vez. Apesar do mecanismo ainda não ser totalmente compreendido, estas células são uma causa crucial na falha dos tratamentos<sup>81</sup>. Um estudo recente mostra que o número de células bacterianas persistentes diminui quando a bactéria mostra resistência genética ao antibiótico<sup>80</sup>. Existem vários processos envolvidos na formação das células bacterianas persistentes que impedem o desenvolvimento de drogas que os inibam<sup>82,83</sup>. No entanto, um estudo atual demonstra que o antibiótico acildespéptido 4 (ADEP4) ativa a protease ClpP tornando-se uma protease não específica que mata as células bacterianas persistentes pela degradação de cerca de 400 alvos intracelulares<sup>81</sup>.

## 2.4. Resistência aos antibióticos

A resistência aos antibióticos existe desde a gênese dos antibióticos. No entanto, o número de organismos resistentes, as localizações geográficas afetadas pela resistência aos antimicrobianos e a amplitude da resistência em organismos individuais não tem precedentes. Desta forma, as resistências a antibióticos envolvem um emergente problema de saúde pública, tendo em conta a morbidade e mortalidade que estas causam, além dos elevados custos que acarretam<sup>84–86</sup>. Para diminuir a resistência a antibióticos e as suas consequências é necessário implementar medidas preventivas, tratar o mais adequadamente possível as infeções e otimizar o seu uso<sup>87</sup>. O termo *super bugs* refere-se a microrganismos com alto nível de resistência aos fármacos que aumentam a morbidade e mortalidade devido à ausência de resposta aos antibióticos. As infeções por *super bugs* limitam as opções terapêuticas, prolongam os períodos de hospitalização e, consequentemente, o custo do tratamento<sup>88,89</sup>. Em alguns casos, também adquirem maior virulência e maior transmissibilidade<sup>89</sup>. Ao longo dos anos, a pressão seletiva pelos diferentes antimicrobianos levou também à resistência a múltiplos fármacos (MDR) em patógenos humanos e animais<sup>90</sup>. Na tabela 2 são apresentados os principais mecanismos de ação e de resistência das famílias de antibióticos.

### **2.4.1. Tipos de resistências**

As resistências podem ser naturais ou adquiridas e transmitidas horizontal ou verticalmente<sup>91</sup>.

A resistência natural é intrínseca a um microrganismo e existe sem uma exposição prévia ao antibiótico, a qual se deve a uma mutação genética espontânea na ausência de pressão seletiva devido à presença de antibióticos<sup>92</sup>. O conhecimento das resistências intrínsecas torna as estratégias de tratamento mais eficazes.

A resistência adquirida pode ocorrer por mutação genética ou por aquisição de genes de resistência a partir de outras bactérias. Estes genes localizam-se, maioritariamente, em fragmentos de ADN, especificamente nos transposões, que permitem que genes de resistência passem facilmente de um plasmídeo para o outro<sup>88</sup>. A maior parte dos mecanismos de resistência adquirida dividem-se em: conjugação, que consiste na troca de material genético entre bactérias, transformação, que ocorre quando há passagem direta de ADN livre de uma célula para a outra, e a transdução em que a troca de material genético faz-se a partir de bacteriófagos<sup>84,88</sup>.

Tabela 2: Principais mecanismos de ação e resistência dos antibióticos.

Classes de antibióticos	Exemplos	Alvo	Mecanismo de ação	Modo de resistência
<b>β-lactâmicos</b>	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos, monobactamo	Enzima transpeptidase	Inibição da formação correta da parede celular bacteriana através do impedimento da formação da ligação cruzada entre cadeias de peptidoglicano	Hidrólise, alteração do alvo e efluxo
	Oxacilinas, meticilina	Enzima β-lactamase	Inibição da enzima de resistência bacteriana, que degrada antibióticos β-lactâmicos	
<b>Macrólidos</b>	Eritromicina, azitromicina			Hidrólise, glicosilação, fosforilação, efluxo e alteração do alvo
<b>Lincosamidas</b>	Clindamicina	Subunidade 50S ribossômica	Inibição da síntese proteica bacteriana.	Nucleotidilação, efluxo e alteração do alvo
<b>Estreptograminas</b>	Dalfopristina e Quinupristina			Acetilação, efluxo e alteração do alvo
<b>Fenicol</b>	Clorofenicol			
<b>Oxazolidinonas</b>	linezolida			Efluxo e alteração do alvo
<b>Aminoglicosídeos</b>	Gentamicina, streptomicina	Subunidade 30S ribossômica	Inibição da síntese proteica bacteriana.	Fosforilação, nucleotidilação, acetilação e efluxo e alteração do alvo
<b>Tetraciclina</b>	Minociclina			Monoxigenação, efluxo e alteração do alvo
<b>Glicopéptidos</b>	Vancomicina, teicoplanina	Dipeptídeo terminal D-Ala-D-Ala do peptidoglicano	Inibição da formação correta da parede celular bacteriana através da formação de um complexo com as cadeias peptídicas não ligadas e bloqueio da transpeptidação.	Reprogramação da biossíntese de peptidoglicanos
<b>Lipopéptidos</b>	Daptomicina	Membrana plasmática	Afeta permeabilidade da membrana bacteriana e bloqueia síntese de ácido pipoteicoico, componente da membrana externa de bactérias Gram-positivas.	Alteração do alvo
<b>Rifamicinas</b>	Rifampicina	RNA polimerase dependente de DNA	Inibição da síntese de RNA.	ADP-ribosilação, efluxo e alteração do alvo
<b>Quinolonas</b>	Fluoroquinolonas,	Enzima DNA girase	Inibição da replicação e reparo do DNA.	Acetilação, efluxo e alteração do alvo
<b>Sulfonamidas</b>	Sulfametoxazol	Enzima di-hidropteroato sintetase	Inibição da formação de cofatores do ácido fólico, importantes para síntese de ácidos nucleicos.	Efluxo e alteração do alvo

## **2.4.2. Bioquímica dos mecanismos de resistências aos antibióticos**

Todos os mecanismos de resistência baseiam-se na modificação do alvo, na diminuição da concentração de antibiótico livre que pode chegar ao alvo, devido aos mecanismos de inativação das enzimas dos antibióticos, ou pelas bombas de efluxo. A resistência a antibióticos pode ser desenvolvida devido a mutações, ou pela aquisição de genes resistentes, através de transferência horizontal de genes<sup>93</sup>. A resistência resulta, na sua maioria, em falhas de tratamentos, ou seja, terapia antibacteriana inadequada, a qual é definida como o uso de antibacterianos para patógenos que não são sensíveis a esses<sup>44</sup>. O prolongamento da terapia antibacteriana também leva ao desenvolvimento de resistências que comprometem a terapia e, além disso, não conseguem ser detetadas por testes de suscetibilidade. A disseminação das resistências na comunidade dificultam o controlo de infeções devido ao aumento exponencial da intra e inter mobilidade populacional. Importa também referir que os custos aumentaram com a carga adicional de resistências que se têm denotado, principalmente ao longo dos últimos anos, tendo um impacto significativo na economia referente aos cuidados de saúde.

### **2.4.2.1. Mecanismos de resistência a $\beta$ -lactâmicos**

Os  $\beta$ -lactâmicos são um grupo de antibióticos que têm especificidade para bactérias e o seu mecanismo de resistência mais comum é a expressão de  $\beta$ -lactamases que hidrolisam o antibiótico. A resistência a  $\beta$ -lactâmicos apareceu ainda antes do primeiro  $\beta$ -lactâmico ter sido desenvolvido<sup>42</sup>.

#### **2.4.2.1.1. ESBLs/AmpC**

No que se refere às  $\beta$ -lactamases de largo espectro (ESBLs), foram identificadas pela primeira vez no início de 1980 e, desde então, têm sido identificados em todo o mundo e encontradas em diferentes organismos, incluindo a *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, e em espécies de salmonela<sup>94,95</sup>. A sua produção, pela *E. coli* e *K. pneumoniae* nos USA, tem prevalência de 6 a 7%. No entanto, na região da Ásia-Pacífico a prevalência, entre 1998 e 1999,

é de 10 a 25% e na França e Itália foi observada a presença de resistência à ceftazidima em 40% das infecções causadas por estirpes de *K. pneumoniae*, pela produção de ESBLs<sup>94,96</sup>. Relativamente à resistência das *Enterobacteriaceae* aos carbapenemos, a incidência é entre 20 e 50% na Grécia, 4 a 24% na Índia e 4 a 11% nos Estados Unidos da América (EUA)<sup>28,54</sup>. Desta forma, torna-se um problema de saúde pública a nível mundial. As ESBLs hidrolisam e causam resistências à cefalosporinas e aos monobactams e são inibidas pelos inibidores  $\beta$ -lactamases: ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam.

A maioria das ESBLs pertencem à classe Ambler A ao incluir os derivados de TEM e SHV, TEM-1 e -2 e SHV-1, que evoluíram devido a mutações pontuais ao redor do centro ativo das  $\beta$ -lactamases. Estas mutações alteram as propriedades da enzima e tornam-nas capazes de hidrolisar os antibióticos. As TEM-1 e SHV-1 conseguem inativar a ampicilina mas não a terceira geração de cefalosporinas<sup>96,97</sup>.

Existem ainda outras linhagens de ESBLs, como a non-TEM e non-SHV e a CTXM-1 à CTXM-15, principalmente na Europa de leste e América do Sul<sup>98,99</sup>. Devido a se localizarem em plasmídeos de grande tamanho também abrigam genes resistentes a outros antimicrobianos<sup>95</sup>. A maioria dos pacientes infetados com organismos produtores de ESBLs são internados nas unidades de terapia intensiva (UTIs)<sup>94,100</sup>.

Apesar das ESBLs não hidrolisarem a cefoxitina, outros isolados clínicos, que produzem ESBL, podem tornar-se resistentes a estes agentes, como a produção concomitante de  $\beta$ -lactamases do grupo 1, AmpC, com a consequente diminuição de permeabilidade de membrana externa<sup>101</sup>. Bactérias pertencentes a *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Serratia* são produtores de  $\beta$ -lactamases AmpC. Estas têm enzimas que são codificadas pelo gene *ampC*, e, quando expostas a  $\beta$ -lactâmicos, têm indução de produção<sup>102</sup>. A hiperprodução de AmpC acarreta hidrólise de cefalosporinas, como ceftazidima e ceftriaxona, o que leva à interrupção do tratamento por esses antibióticos. As cefalosporinas de quarta geração e os carbapenemos são mais resistentes à hidrólise pela AmpC<sup>102,103</sup>.

### 2.4.3. Mecanismos de multirresistência a antibióticos

A MDR define-se como a sensibilidade ou resistência de um microrganismo a vários antimicrobianos, apesar de anterior sensibilidade, o que leva a um tratamento ineficaz e, como

consequência, persistência e propagação das infecções<sup>104</sup>. Na figura 5 são apresentados os vários mecanismos de multirresistência.

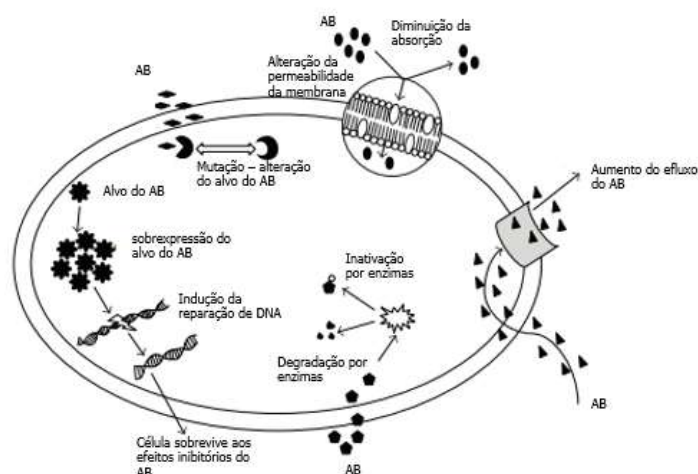


Figura5: Mecanismos de MDR<sup>26</sup>.

#### 2.4.3.1. Alteração da proteína alvo

As bactérias podem tornar-se resistentes por meio de mutações que induzem a menor sensibilidade da proteína alvo ao agente. A forma como esta resistência é ou não transferida para outras células nos plasmídeos depende do mecanismo de ação do fármaco.

A principal resistência deste tipo ocorre na presença de fluoroquinolonas devido a mutações nas enzimas alvo, as topoisomerases do ADN<sup>73</sup>. Com as fluoroquinolonas, a adição do gene que codifica para uma enzima resistente ao fármaco não fará com que as bactérias sejam completamente resistentes e a transferência mediada por plasmídeo do gene alvo mutante é improvável de ocorrer<sup>72</sup>. No entanto, as mutações irão tornar-se mais prevalentes por seleção clonal, na presença de pressão seletiva<sup>44</sup>.

Outro exemplo de resistência relativa à modificação do alvo é conferida ao gene *erm*, o qual é um plasmídeo codificado e produz a metilação de adenina na posição 2058 do 50S RNAr, o que causa resistência aos Macrólidos, como a Eritromicina, às Lincosamidas e Espstreptogramina do grupo B<sup>105</sup>. A base molecular deste fenótipo foi elucidada através da estrutura de cristal da subunidade ribossomal 50S<sup>106</sup>.



Os enterococos, apesar de resistentes a mais antibióticos, quando resistentes à vancomicina têm um mecanismo único na síntese do peptidoglicano usando uma via alternativa e criando percursos diferentes de peptidoglicano, alteração que leva a acyl-D-Ala 4-DLac5 em vez de acyl D-Ala 4 D-Ala5, como na síntese normal<sup>61,107</sup>.

#### **2.4.3.2. Inativação enzimática do antibiótico**

Este mecanismo é comum para a resistência a antibióticos de origem natural, como os Aminoglicosídeos, os quais são inativados por fosforilação enzimática, através do aminoglicosídeo fosforil-transferase (APH), acetilação, através do Aminoglicosídeos acetiltransferase (AAC), ou adenilação, através dos Aminoglicosídeos adeniltransferase.

Também é comum em  $\beta$ -lactâmicos pois são inativados por hidrólise enzimática, pelas  $\beta$ -lactamases, geralmente no periplasma<sup>108</sup>. Os genes que codificam estas enzimas de inativação podem facilmente produzir resistências como componentes genéticos adicionais sobre os plasmídeos<sup>108,109</sup>.

#### **2.4.3.3. Bombas de efluxo**

As bombas de efluxo são proteínas presentes nas membranas e é o mecanismo predominante nas MDR. Neste tipo de resistência ocorre um efluxo, isto é, o transporte ativo dos antibióticos do meio intracelular para o meio extracelular<sup>110</sup>. Este mecanismo afeta todas as classes de antibióticos no entanto apresenta maior eficácia na presença de macrólidos, tetraciclina e fluoroquinolonas, pois estes inibem a biossíntese de proteínas e de ADN<sup>111</sup>.

As bombas de efluxo categorizam-se em cinco classes: Família facilitadora *major* (MFS), efluxo tóxico e multirresistente, (MATE), família de resistência-nodulação-divisão (RND), *small multidrug resistance*, (SMR) e *adenosine triphosphate binding cassette* (ABC). A MFS, MATE, RND e SMR funcionam por troca de prótons, enquanto a ABC atua por hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) <sup>111,112</sup>. A sobre-expressão de genes que codificam as bombas de efluxo MDR é responsável pela expulsão precoce do fármaco da célula, mantendo

as funções celulares das bactérias intactas<sup>113</sup>. Essa sobre-expressão, em algumas estirpes, afeta também a fluidez e permeabilidade, conduzindo a um efluxo dependente de ATP dos antimicrobianos o que diminuiu a sua concentração intracelular<sup>114</sup>.

## 2.5. Estirpes Bacterianas

As bactérias são as mais abundantes de todos os organismos e são as únicas caracterizadas por organização celular procariota. Existem dois tipos principais que são categorizados através da coloração de Gram e, desta forma, dividem-se em Gram-positivas, caso retenham a coloração roxa e rosa, e Gram-negativas se retêm apenas a cor rosa<sup>115</sup>. As Gram-positivas e Gram-negativas diferenciam-se, primariamente, pela parede celular visto que as Gram-negativas têm uma camada mais espessa revestida por lipopolissacarídeos que tornam a sua natureza mais resistentes aos antibióticos (figura 6). Quanto à sua síntese de energia, pode ser realizada na presença de oxigênio, aeróbias, na ausência de oxigênio, anaeróbias, ou ser viver tanto na presença como ausência de oxigênio, anaeróbias facultativas<sup>29,70,116</sup>.

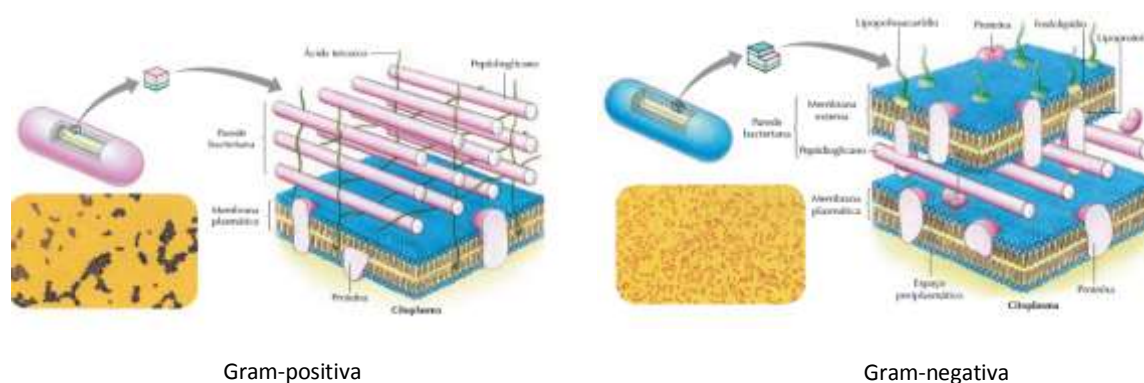


Figura 6: Estrutura da parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. (micrografias por microscópio ótico com aumento de 1.000x) (Amabis, M. & Martho, G. 2009).

### **2.5.1. *Escherichia coli***

A *E. coli* é um bacilo, Gram-negativa, anaeróbia facultativa, na forma de esporos, e afeta primordialmente a mucosa intestinal provocando diarreias, muitas vezes com muco e sangue. Estas bactérias existem comensalmente no trato gastrointestinal humano, e normalmente, só causam doenças quando o indivíduo está imunodeprimido ou há lesões no muco intestinal<sup>117</sup>. No entanto, existem vários clones de *E. coli* altamente adaptadas que adquiriram virulência com atributos específicos, o que confere uma maior capacidade de adaptação a novos meios e permite um espectro maior de doenças. Estes atributos de virulência são frequentemente codificados em elementos genéticos que se mobilizam em estirpes diferentes para novas combinações de virulência. A maioria das combinações de sucesso de fatores de virulência têm persistido e tornaram-se capazes de causar doenças mesmo em indivíduos saudáveis<sup>109,117,118</sup>.

### **2.5.2. *Staphylococcus aureus***

A bactéria *S. aureus* é das mais comuns e provoca uma grande variedade de infecções, principalmente ao nível da pele e dos tecidos moles, e estão associadas a cuidados de saúde invasivos<sup>103,119</sup>. Os fatores de virulência microbiana de *S. aureus* têm sido geralmente agrupados em fatores estruturais, produtos segregados e mecanismos de resistência a antimicrobianos<sup>120</sup>. Esses fatores são produtos segregados mas também uma parte da estrutura da célula da bactéria em questão, os quais são considerados biofilmes apesar de não serem produzidos por todas as estirpes *S. aureus*. Os biofilmes são complexos de agregados de microrganismos marcados pela produção de uma matriz protetora e adesiva, os quais são produzidos depois da aderência da célula bacteriana à superfície de um hospedeiro e agregam comunidades de células criando uma barreira contra as defesas do hospedeiro<sup>121,122</sup>.

### **2.5.2.1. *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina**

Os *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina-associados com os cuidados de saúde (MRSA-AH) tem proporções graduais, desde 1960<sup>123,124</sup>. No entanto, atualmente, tem-se observado também um aumento do número de casos de MRSA-associados com a comunidade (MRSA-AC) a qual difere da MRSA-AH no padrão de sensibilidade – mais sensível a mais antimicrobianos que MRSA-AH-, e inclui fatores de virulência específicos<sup>120</sup>. A MRSA-AC está a ter proporções pandémicas, principalmente nos EUA<sup>125</sup>, mas já se alastra a vários outros países<sup>120</sup>. A MRSA-associada à pecuária (MRSA-LA) também está a aumentar desde 2000, e relaciona-se com o uso de antibióticos como promotores de crescimento nos animais<sup>90</sup>, no entanto parece ser menos virulenta e menos transmissível do que MRSA-AC<sup>90,126</sup>.

### **2.5.3. *Enterococcus faecalis***

No geral, os *Enterococcus* são mais resistentes à vancomicina e, entre 1989 e 1993, a prevalência foi de 0,3% a 7,9%<sup>127</sup>. Em 2004, a taxa subiu para 28,5%, o que significa um crescimento de 12% face a 1998 e 2002<sup>128</sup>. A *E. faecalis* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa e é comumente encontrada no lúmen intestinal humano, com colonizações de  $10^{11}$ , e também na área genital feminina e na cavidade oral<sup>129</sup>. A *E. faecalis* está associada a infeções endodônticas assintomáticas, persistentes, visto que já por si é um habitante natural da cavidade oral. É capaz de suprimir a ação dos linfócitos, o que contribui para a infeção bucal<sup>130</sup>. Além de possuir vários fatores de virulência, é capaz de compartilhar traços de virulência, devido aos seus elementos móveis poderem ser transferidos por conjugação dos plasmídeos *pheromone-responsive* entre as espécies, o que leva a maior sobrevivência e contribui para a sua capacidade de causar a doença, e para a sua evolução em meio hospitalar<sup>131,132</sup>. Tem, também, um papel importante nas infeções do trato urinário, sendo o patogéneo mais associado a patologias do trato urinário inferior, com uma capacidade de virulência maior que a *E. coli*<sup>133</sup>.

#### **2.5.4. *Klebsiella pneumoniae***

A *K. pneumoniae* é um bacilo Gram-negativo, aeróbio facultativo, mas com melhor crescimento em condições aeróbias. É encontrada em locais como água, solo, plantas e esgoto. Desta forma, a colonização em seres humanos ocorre devido ao contato com o meio ambiente e coloniza o trato gastro intestinal de forma comensal, mas quando coloniza a orofaringe ou fezes humanas leva a quadros de infecção<sup>134</sup>. Estudos indicam que as infecções causadas por *K. pneumoniae* carbapenemases, em 2000, foram < 1% e em 2007 a percentagem aumentou para 8%<sup>6</sup>. As infecções por *K. pneumoniae* estão associadas ao trato urinário, septicemia intra-hospitalar e pneumonia, causando elevada comorbilidade e mortalidade em pacientes hospitalizados<sup>135,136</sup>. A sua elevada resistência é também devido à cápsula que exibe a qual reduz a fagocitose pelos macrófagos aumentando a sua resistência<sup>137</sup>.

#### **2.5.5. *Staphylococcus saprophyticus***

A *S. Saprophyticus* é um Gram-positivo, anaeróbio facultativo. O trato gastrointestinal é o principal reservatório de *S. saprophyticus* e a colonização rectal, vaginal e uretral está associada com os cuidados de saúde<sup>138</sup>. A *S. saprophyticus* é a única espécie de *Staphylococcus* que é uropatogénica e o que a distingue das restantes pertencentes a *Staphylococcus* é o facto de processar um gene que codifica para *D-serina*-deaminase, uma enzima que cataboliza D-serina em piruvato e amónia<sup>139,140</sup>. É igualmente caracterizada por se ligar a diferentes proteínas da matriz como o colagénio e a fibronectina e tem propriedades de superfície diferente como hidrofobia e hemaglutinação<sup>141–143</sup>.

#### **2.5.6. *Salmonella enterica***

A *S. enterica* é um bacilo Gram-negativo, é anaeróbia facultativa e tem a capacidade de lidar com condições adversas como: baixa abundância de nutrientes e iões metabólicos, ou seja,

a sua versatilidade metabólica dá-lhe capacidade para resistir à imunidade do hospedeiro<sup>144</sup>. A *S. enterica* incluiu seis subespécies que são caracterizadas pela sua bioquímica e natureza dos antígenos<sup>145</sup>. A infecção por *S. enterica* ocorre devido a comida e ou água contaminada, ou através de animais infetados por contacto com ambientes infetados com matéria fecal<sup>146</sup>.

### **2.5.7. *Enterobacter cloacae***

A *E. cloacae* é um bacilo Gram-negativo, é anaeróbia facultativa e encontra-se em ambientes aquáticos e terrestres. Está presente, comensalmente, no trato intestinal humano e animal<sup>147</sup>. A *E. cloacae* é importante como um patógeno nosocomial sendo o responsável por até 5% de *sepsis* nosocomial, 5% das pneumonias nosocomiais, 4% das infeções urinárias hospitalares e 10% dos casos de peritonite pós-cirúrgicas<sup>148</sup>. Estudos recentes apontam que os biofilmes da *E. cloacae* são expressos devido ao papel ativo de proteínas *fimbriae curli*<sup>149,150</sup>.

Quanto às resistências, estudos começam a demonstrar que a *E. cloacae* adquiriu MDR, através da produção de ESBLs e  $\beta$ -lactamases VEB-3, e alguns surtos começam a apresentar-se em vários países, como China, Espanha e Grécia<sup>151,152</sup>.

### **2.5.8. *Enterobacter aerogenes***

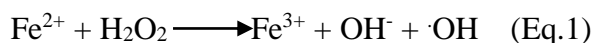
A *E. aerogenes* é um bacilo Gram-negativo, é anaeróbica facultativa e encontra-se, comensalmente, no trato gastrointestinal humano, causando danos a pessoas imunodeprimidas, pois é de natureza nosocomial<sup>153</sup>. Esta é a responsável por 15% a 20% de todas as infeções por *Enterobacter spp.* Estes podem ser agentes causais de pneumonia, infeções do trato urinário (ITU), meningite, infeção em feridas e infeções relacionadas a dispositivos intravasculares e protéticos<sup>85</sup>. Tem uma elevada capacidade adaptativa, facilmente adquire resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos durante a terapia e a sua resistência a antibióticos está associada a alta taxa de mortalidade<sup>154</sup>. Nos últimos anos, os isolados desta espécie, que são naturalmente

resistentes a aminopenicilinas, expressaram MDR a  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas e tetraciclinas<sup>112,155</sup>.

### 3. *Stress* oxidativo

A definição de *stress* oxidativo define-se como o desequilíbrio entre os oxidantes e os antioxidantes e divide-se entre os dois resultados mecanicistas: os danos macromoleculares, os quais tem ligação aos mecanismos oxidativos relativos aos radicais livres, e a interrupção de circuitos de controlo e sinalização redox, que se baseia na cinética da xantina oxidase<sup>156,157</sup>. O *stress* oxidativo é um processo natural e intrínseco ao metabolismo humano. As enzimas responsáveis por manter o seu nível fisiológico baixo são os antioxidantes. Mas, na falta destas enzimas a homeostase não se mantém e, consequentemente, os radicais livres passam a ter um papel predominante.

Os radicais livres são moléculas pequenas, difusíveis, têm um eletrão não emparelhado e tendem a ser reativos em reações em cadeia, danificando múltiplas células<sup>158</sup>. Portanto, o *stress* oxidativo tem sido alvo de muitos estudos nos últimos anos visto que é associado como causador e catalisador de vários processos patológicos. As doenças relacionadas com a idade como a diabetes, as doenças cardiovasculares, cancro e doenças neurodegenerativas, e a resistência das bactérias estão cada vez mais ligadas ao elevado *stress* oxidativo<sup>159–164</sup>. Alguns estudos sugerem que o tratamento com antibióticos resultam no aumento do *stress* oxidativo através da reação de *Fenton* (Eq.1), mas também há estudos que contrariam estes resultados<sup>165–167</sup>. No entanto, um elevado nível de antioxidantes protege a bactéria da resposta imunitária do hospedeiro assim como a resposta à terapia antibacteriana<sup>168,169</sup>. Na figura 7 são apresentados a origem dos ROS e as suas consequências fisiológicas.



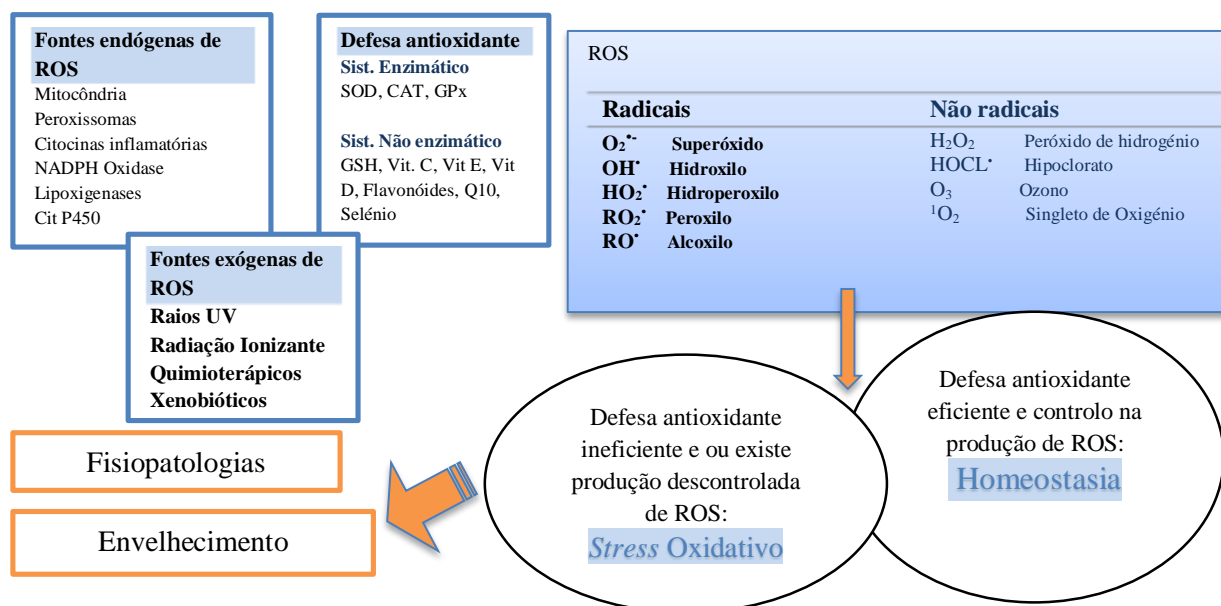


Figura7: Origem das espécies reativas de oxigênio (ROS): Os antioxidantes são gerados no metabolismo normal e nas mitocôndrias, peroxissomas e em várias enzimas citosólicas. Os sistemas de defesa antioxidantes mantêm a homeostase fisiológica, se estiverem em equilíbrio. Se eles estiverem desequilibrados por serem menos que os oxidantes, ocorre o *stress* oxidativo que conduz a dano celular e que se manifesta clinicamente como envelhecimento patológico ou condições fisiopatológicas.

### 3.1. Fatores de *stress* oxidativo

#### 3.1.1. Fontes não enzimáticas

Os radicais livres incluem espécies radicais reativas a oxigênio,  $O_2^{\cdot-}$  e  $OH^{\cdot}$ , mas também formas não radicais reativas a oxigênio,  $H_2O_2$ ,  $^1O_2$  e  $O_3$ , os quais se envolvem em reações de oxidação tornando-se potencialmente nocivos para as células<sup>170,171</sup>. As espécies reativas a oxigênio (ROS), em baixas concentrações, são vitais para a defesa celular, controlo de processos celulares fisiológicos como a expressão genética, e a apoptose em vias de transdução de sinal como segundos mensageiros. Em elevadas concentrações, excedendo a capacidade antioxidante da célula, os ROS tem uma atividade ilimitada de oxidação das moléculas e dos componentes celulares, o que leva à destruição de biomoléculas e de células<sup>157</sup>.



### 3.1.2. Fontes enzimáticas

As fontes enzimáticas encontram-se no espaço intracelular. A monoamina oxidase, contida numa hemo, presente na membrana mitocondrial externa catalisa a desaminação oxidativa de amins e, portanto, produz  $\text{H}_2\text{O}_2$  e citosol na matriz o que leva à lesão celular. A NADPH oxidase, presente nos neutrófilos, tem um papel importante nas defesas do hospedeiro contra a invasão de micróbios através da geração de superóxidos<sup>172</sup>. A xantina oxidoreductase está presente na forma de xantina dehidrogenase, a qual é transformada em xantina oxidase produzindo assim  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2^{-173}$ . A mieloperoxidase cataliza  $\text{H}_2\text{O}_2$  e outros substratos ácidos altamente reativos<sup>174</sup>. O Citocromo P450 oxidase, presente na mitocôndria, faz parte de vários metabolismos e catabolismos, onde transfere dois elétrons; um está ligado a oxigénio e uma parte do oxigénio é reduzida em superóxidos, inevitavelmente<sup>169</sup>.

## 3.2. Mecanismos de regulação do *stress* oxidativo

### 3.2.1. Antioxidantes enzimáticos

O mecanismo para a eliminação do potencial oxidante inclui uma complexa rede bioquímica da qual fazem parte, maioritariamente, a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT), a S-transferase da glutathione (GST) e a peroxidase da glutathione (GPx)<sup>158</sup>. A função antioxidante do GSH depende principalmente do seu papel como um componente da via enzimática que as células desenvolveram contra ROS, que consiste em GPx e redutase da glutathione (GR). A GPx catalisa a conversão de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , produzido pela SOD com a dismutação do anião superóxido em água. A GR contém  $\text{FADH}_2$  e utiliza equivalentes redutores a partir de NADPH para reverter a GSSG em 2GSH e assim regenerar a GSH<sup>162</sup>. A figura8 demonstra todos os mecanismos e suas interações.

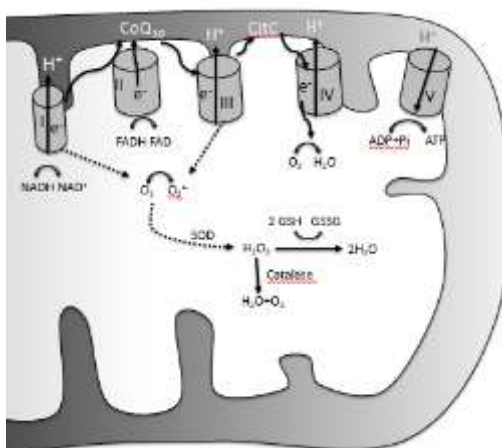
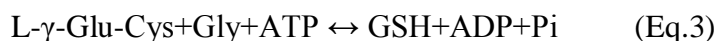
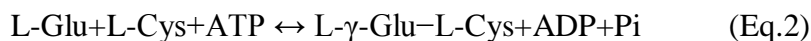


Figura 8: O *stress* oxidativo e a disfunção na mitocôndria: A transferência de elétrons em complexos I, III e IV por NADH produz um gradiente de prótons sobre a membrana mitocondrial externa e gera um potencial entre a membrana mitocondrial interna e membrana mitocondrial externa. Os ROS são subprodutos da passagem de elétrons. Estes são passados do complexo II para o complexo III. Visto que são dadores de elétrons, o excesso de NADH e FADH<sub>2</sub> produz um elevado gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna, o que aumenta o volume dos complexos iniciais, e assim produz um aumento dos níveis de radicais. Abreviações: e<sup>-</sup>: elétrons; CoQ10: Coenzima Q10; CitC: Citocromo C; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: Superóxido; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; SOD: dismutase do superóxido. (Adaptada de Leininger, GM et al, 2006<sup>175</sup>)

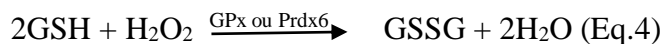
### 3.2.1.1. Bioquímica e funções das glutathionas

A Glutathiona, *L-γ-glutamyl-L-cysteinylglycine*, é a principal defesa celular antioxidante na proteção das células das toxinas exógenas. A glutathiona reduzida (GSH), um substrato da GPx e da GST, fornece uma primeira linha de defesa contra ROS ao eliminar os radicais livres e reduzir o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>176</sup>. A GSH é sintetizada no espaço intracelular, com concentrações entre 0,2 e 10 mM, por ações sequenciais da sintetase da g-glutamilcisteína (GCS) (Eq.2), e da sintetase da glutathiona (GS) (Eq.3), numa série de reações catalisadas por enzimas, que têm sido denominados como o ciclo *γ*-glutamil<sup>177,178</sup>.



Algumas das funções das glutathionas referem-se a: capacidade para várias reações e desempenho de um papel importante na desintoxicação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e outros peróxidos e radicais livres. A função de glutathiona na desintoxicação do organismo é patente a uma grande variedade de xenobióticos, o que comprova o seu papel na desintoxicação<sup>179</sup>. A maior parte da GSH é

utilizada por três elementos da GPx e também pela peroxirredoxina 6 (Prdx6) (Eq.4). Estas enzimas catalisam a redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e de GSH em GSSG. No entanto, a Prdx6 exige a presença de GST para ser activado<sup>180</sup>.



#### 3.2.1.1.1. Bioquímica de GSH/GSSH

A taxa de síntese de GSH é controlada pela disponibilidade de substrato, principalmente L-cisteína, a qual é a quantidade e proporção relativa entre as duas subunidades do GCS e a medida da inibição de retorno da GCS por GSH<sup>177,181</sup>. A GSH e GSSG constituem as formas de glutathione livre e representam o total de glutathiones. O equilíbrio do estado *redox* das glutathiones é mantido pelo rácio de GSH/GSSG o qual se mantém em níveis estáveis através do NADPH que por sua vez está dependente da atividade da GR. Quando ocorre *stress* oxidativo, o GSH citosólico e o GSSG são exportados para o espaço extracelular por transportadores de membrana plasmática, pois as reações antioxidantes ocorrem no espaço extracelular<sup>182–184</sup>. O GSSG, que acaba por ser a forma oxidada de GSH, é caracterizado por uma ligação dissulfureto entre duas moléculas de GSH. Este é reduzido novamente em GSH através do NADPH, que depende da catálise da GR<sup>185</sup>. Com efeito, a GSH e sistemas enzimáticos relacionados com GSH são ferramentas eficazes que as células exploram na desintoxicação.

#### 3.2.2. Antioxidantes não enzimáticos

Os antioxidantes não enzimáticos são moléculas de baixo peso molecular e incluem, principalmente, ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, co-fatores enzimáticos como o Q10, selénio e flavonoides.

O ácido ascórbico tem dois compostos com propriedades antioxidantes: L-ascórbico e

o L- dehydroascórbico. Este tem quatro grupos OH, 2 dos quais são átomos de carbono adjacente, e é capaz de quebrar iões de metais e desintegrar radicais livres, visto que reduz  $\bullet\text{O}_2$ <sup>186</sup>.

O  $\alpha$ -tocoferol, uma das formas da vitamina E, encontra-se maioritariamente nos lípidos e impede a propagação das reações em cadeia, nas membranas plasmáticas, induzidas pelos radicais livres. O grupo livre OH no seu anel aromático é o responsável pelas suas propriedades antioxidantes<sup>187</sup>.

A Coenzima Q10, único antioxidante solúvel lípido sintetizado endogenamente, na sua forma reduzida, ubiquinol (CoQH<sub>2</sub>), inibe a oxidação proteica através da inibição da peroxidação lipídica<sup>188</sup>.

Quanto aos flavonoides, os compostos mais estudados são o ácido cafeico, o ácido gálico e o ácido elágico, os quais inibem a peroxidação lipídica, pela captação de radicais livres<sup>189</sup>.

O selénio, como um componente enzimático, tem funções antioxidantes ao atuar contra a peroxidação lipídica. A sua função protetora é devida, maioritariamente, à sua presença na GPx<sup>190</sup>.

### 3.3. Relação entre o *stress* oxidativo e a ação bacteriana

Os fagócitos estão nas primeiras linhas de defesa contra patógenos, têm enzimas específicas que geram ROS antimicrobianas e, consequentemente, a atividade antioxidante dos patógenos tem um papel importante na colonização e persistência do local de infeção. A *E. faecalis* está preparada para sobreviver ao *stress* oxidativo e é altamente resistente aos fagócitos<sup>191,192</sup>. Esta resistência deve-se ao superóxido dismutase do manganês (Mn-SOD), a três peroxidases dependentes de NADH nomeadamente alcahidroperóxido redutase, tiol peroxidase, e NADH-peroxidase<sup>191,193</sup>. No entanto, dentro dos *Enterococcus* várias espécies são produtoras de níveis elevados de ROS, mais especificamente de  $\text{O}_2^-$  extracelular e  $\text{H}_2\text{O}_2$ : *E. casseliflavus*, isolados de *E. faecium*<sup>194,195</sup>.

A *E. coli* também produz  $\text{O}_2^-$  extracelular no entanto uma quantidade mil vezes inferior a estas espécies<sup>196</sup>. Ainda referente à *E. coli*, um estudo recente mostra que a perda de sigma-s na fase estacionária da *E. coli* torna-a mais sensível à gentamicina, com baixa utilização da sua

ação antioxidante. Desta forma, a gentamicina atua na fase estacionária da bactéria através da formação de ROS podendo assim direcionar a defesa antioxidante da *E. coli* e, por consequência, tem uma melhor eficácia antibacteriana<sup>197</sup>.

Outro mecanismo relacionado com o *stress* oxidativo são as bombas de efluxo MDR em que o aumento da sua expressão pode dar maior proteção contra o *stress* oxidativo e facilitar a sobrevivência das bactérias, na presença da mesma concentração intracelular de antibiótico. Nas bombas de efluxo MDR há uma sobreposição reguladora bem estabelecida entre as respostas do *stress* oxidativo e o antibiótico. As bombas de efluxo *acrAB* são reguladas pelo sistema superóxido-sensível (*soxR*), e tem sido sugerido que *soxR* regulado por genes leva a uma reposta contra os antibióticos<sup>158,198</sup>. Neste caso, a elucidação dos passos após as interações droga-alvo, mas antes da depleção do NADPH, é essencial para perceber o mecanismo de morte das bactérias<sup>198</sup>.

A *M. tuberculosis*, devido à multiplicidade de caminhos dos ROS, tem proteção contra antibióticos, implicando os ROS na inibição da sua ação antibacteriana<sup>164</sup>. A ligação entre a resposta do *stress* oxidativo e a tolerância ao antibiótico foi também demonstrada em modelos intracelulares usando a bactéria *Mycobacterium marinum* onde esta exibe tolerância ao antibiótico logo após a fagocitose. Este fenótipo de tolerância depende da expressão das bombas de efluxo as quais têm sido implicadas no mecanismo de resposta do *stress* oxidativo como mecanismo para as bactérias danificadas pelos ROS<sup>199</sup>.

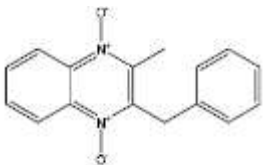
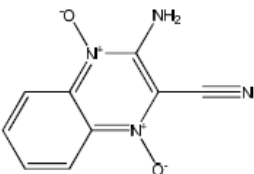
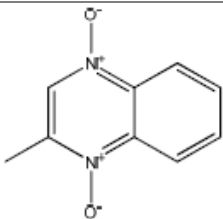
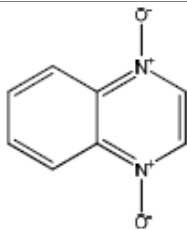
## 4. Quinoxalinas e seus derivados

Os derivados das quinoxalinas são objeto de interesse na saúde e a nível industrial visto que são intermediários importantes tanto para fármacos como para materiais tecnológicos<sup>200</sup>. No entanto, ao longo do presente estudo só a vertente clínica será estudada. Como referido inicialmente, as quinoxalinas são compostos heterocíclicos de carácter sintético.

#### 4.1. Derivados da quinoxalina 1-4 dióxido

Os compostos estudados designam-se em quinoxalina 1,4-dióxido (QNX), 2-metil-3-benzilquinoxalina-1,4-dióxido (2M3BQNX), 2-metilquinoxalina-1,4-dióxido (2MQNX) e 2-amino-3-cianoquinoxalina-1,4-dióxido (2A3CQNX), os quais são apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Derivados de quinoxalinas em estudo <sup>201</sup>.

2-metil-3-benzil quinoxalina-1,4- dióxido (2M3BQNX)	2-amino-3- cianoquinoxalina-1,4- dióxido (2A3CQNX)	2-metilquinoxalina-1,4- dióxido (2MQNX)	Quinoxalina -1,4- dióxido (QNX)
			

#### 4.2. Atividade antimicrobiana das quinoxalinas e seus derivados

Diversos derivados das quinoxalinas têm mostrado muitas propriedades antibacterianas e por isso o seu potencial continua ativo em pesquisa. Na tabela 4 são apresentados exemplos de derivados de quinoxalinas com atividade antibacteriana, já estudados.

Tabela 4: Atividade antimicrobiana de derivados de quinoxalinas.

Atividade antimicrobiana de derivados de quinoxalinas		
Nome	Atividade	Referência
2-hidróxido-3- metilo quinoxalina-1,4-di- <i>N</i> óxido	Antibacteriano contra Gram-negativas	Francis J, et al (1955) <sup>202</sup>
1,2,3-trisubstituída-1,4-dihidrobenzoquinoxalina-5,10-dionas	Antibacteriano contra <i>K. Pneumoniae</i> e <i>E. coli</i>	Vishnu et al (2006) <sup>203</sup>
2,3-bis(bromometilo)quinoxalina	Antibacteriano contra Gram-negativas	Sanna P, et al (1999) em Jadhavar, P. et al (2014) <sup>204</sup>
oxazolo(4,5- <i>b</i> )quinoxalina-2-yl-hidrazona	Antibacteriano com melhor resposta do que amoxicilina	Khan, S. e Asiri, A. (2011) <sup>205</sup>
Equinomicina	Antibacteriano contra resistência e biofilmes de <i>S. aureus</i> e <i>E. faecalis</i> .	Watanabe, K et al. (2009) em Krota, V. et al (2014) <sup>19</sup> ; Soja, A et al (2009) <sup>206</sup>
2-carboxamidaquinoxalina 1,4-di- <i>N</i> -óxido	Atividade antimicobacteriana*	Radwan, A. e Abdel-Mageed, W. (2014) <sup>12</sup>
<i>N'</i> -(2-clorobenzilideno)-3-hidroxi-7-metilquinoxalina-2-carbohidrazida	Antibacteriano contra <i>S. aureus</i> comparando com ofloxacina. Máxima atividade contra a <i>E.coli</i>	Kumar, A et al. (2009) <sup>207</sup>
1,2-dihidro-3-(2-metil ( <i>1H</i> )-imidazol[1,2- <i>a</i> ]piridin-3-ilo)quinoxalina	Atividade antibacteriana contra <i>Bacillus spericus</i> e <i>E.coli</i>	Reddy, B e Reddy, M (2010) <sup>208</sup>
3-arylquinoxalina-2-carbonitrilo di- <i>N</i> -óxido	Atividade antibacteriana contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	Moreno, E e Pérez, S. (2013) <sup>209</sup>
1-((3-metil-5-oxo-4,5-dihidro-( <i>1H</i> )-pirazol-4-il)metil)quinoxalina-2,3( <i>1H,4H</i> )-diona	Atividade antimicobacteriana	Ramalingam, P et al. (2010) <sup>210</sup>
2,9,10-trisubstituída-6-oxo-7,12-dihidrocromeno[3,4- <i>b</i> ]quinoxalina	Atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	Sandeep, A. Et al (2006) <sup>211</sup>
2-[4-(arilidenohidrazinocarbonil) anilina]-3-metilquinoxalina	Atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> e <i>C. albicans</i>	Refaat, H. et al (2004) <sup>212</sup>

## 5. Objetivos

### 5.1. Objetivo geral do presente estudo:

- Avaliar a atividade antimicrobiana das quinoxalinas e seus derivados em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, com e sem resistências a antibióticos. Inferir a influência destes compostos no *stress* oxidativo.

#### 5.1.2. Objetivos específicos:

- Avaliar a atividade da quinoxalina-1,4-dióxido (QNX) e seus derivados em bactérias Gram-positivas, *E. faecalis*, *S. saprophyticus*, *S. aureus* e MRSA, e Gram-negativas, *S. enterica*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *E. coli* Tem 180, *E. coli* Tem 201 e *E. cloacae*;
- Determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) através do método de Microdiluição;
- Efetuar o estudo do crescimento microbiano ao longo do tempo, 24h, na CMI, com e sem composto e, desta forma, avaliar a significância da atividade antimicrobiana dos compostos;
- Avaliar o rácio GSH/GSSH das estirpes bacterianas sujeitas à presença dos derivados da quinoxalina que apresentam atividade antibacteriana.





## **Capítulo II:**

# **Materiais e métodos**

## 6. Materiais e métodos

### 6.1. Concentrações da Quinoxalina-*N,N*-dióxido e derivados

Foram preparadas soluções de *stock* das quinoxalinas utilizadas, QNX, 2MQNX, 2A3CQNX e 2M3BQNX, com a concentração de 2mg/mL. Soluções mais diluídas foram preparadas a partir desta. Uma vez que as quinoxalinas são fotossensíveis, é importante manter as soluções protegido da luz, de forma a evitar a sua degradação. Todos os compostos foram filtrados antes de qualquer ensaio. Foram utilizados filtros de membrana provenientes da Pall Life Sciences® (GHP Acrodisc 13mm Syringe filter 0,45µm GHP membrane; GHPolypro 47 mm 0,45µm hydrophilic Polypropylene Membrane filters).

### 6.2. Estirpes bacterianas

Como modelos procariotas, foram utilizadas as estirpes *S. enterica* spp, *K. pneumoniae* spp, *E. Faecalis* spp, *S. saprophyticus* spp, *E. aerogenes* spp e *Enterobacter cloacae* spp. Estas estirpes foram armazenadas à temperatura de -80 ° C.

### 6.3. Método para o Teste de Suscetibilidade antimicrobiana

As estirpes foram cultivadas em *Trypticase Soy Agar* (TSA) e incubadas a 37° durante 18 a 24h. Os componentes e as respetivas quantidades utilizadas encontram-se descritos na tabela 5. Depois da obtenção de culturas puras em TSA, utilizaram-se as colónias isoladas para preparar suspensões microbianas em meio *Tryptic Soy Broth* (TSB) com uma densidade ótica e 0,2 (GENESYS 20). Desta forma, e para um volume final de 200µL, fez-se uma diluição de 10 vezes para equivaler a essa densidade. Este valor foi calculado segundo a escala de McFarland de 0,5 -  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colónias (UFC)/mL. De acordo com o método, foram utilizadas  $0,6 \times 10^7$  UFC/mL, por poço, em todos os ensaios.

Usaram-se microplacas de 96 poços onde se realizaram os testes de suscetibilidade a diferentes concentrações de composto para as diferentes estirpes. Essas concentrações

utilizadas resultaram da diluição volumétrica da solução-mãe, de acordo com: 1:1, 1:1.2, 1:1.4, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:8, 1:16 e 1:32, para um volume final, em cada poço, de 200  $\mu\text{L}$ . Adicionou-se também uma linha para o controlo positivo (bactérias e meio), outra para o controlo negativo (apenas meio), e outra para o branco (composto e meio). O volume de bactéria foi constante em todos os poços, correspondendo a 20  $\mu\text{L}$  da solução bacteriana preparada anteriormente. Foram alteradas, ao longo dos ensaios, apenas as concentrações do meio e do composto com o cálculo de volume final em cada poço de 200  $\mu\text{L}$ . No final, as microplacas foram fechadas e incubadas a 37°, entre 18h a 24h.

A MIC do composto foi testada através da observação da turvação do meio, comparando com o controlo negativo, controlo positivo e branco e os resultados obtidos foram confirmados e comparados através de réplicas. Este procedimento realizou-se segundo os critérios do CLSI para os antimicrobianos disponíveis comercialmente (M7- A7—*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Seventh Edition*)<sup>213</sup> e adaptados para os compostos estudados.

Tabela 5 : Método para o Teste de Suscetibilidade antimicrobiana.

<b>Meio para microdiluição</b>	Tryptic Soy Broth (TSB)
<b>Meio para cultivo de estirpes</b>	Trypticase Soy Agar (TSA)
<b>Bactérias testadas</b>	<i>Salmonella enterica</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> Tem 180, <i>Escherichia coli</i> Tem 201 e <i>Enterobacter cloacae</i>
<b>O volume de suspensão microbiana no meio</b>	20 $\mu\text{L}$
<b>Comprimento de onda do espectrofotómetro</b>	620 nm
<b>Concentração dos compostos</b>	2mg/mL
<b>Volume utilizado de composto</b>	10-170 $\mu\text{L}$
<b>Temperatura de incubação</b>	37°
<b>Tempo de incubação</b>	24h

## **6.4. Avaliação do crescimento bacteriano sujeito ao composto**

Após a determinação da CMI, realizaram-se os procedimentos para a avaliação das curvas de crescimento. Desta forma, utilizou-se uma concentração inferior ao valor de CMI e a CMI, incluindo-se sempre os controlos positivos e o branco. Através do leitor de microplacas Thermo Scientific Multiskan FC procedeu-se à recolha dos dados que permitiram avaliar o crescimento das estirpes na presença do composto. O ensaio foi desenhado de forma a se obterem valores de densidades nos tempos 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 e 24.0 horas.

## **6.5. Análise por HPLC**

A análise por HPLC integra uma fase móvel líquida e uma fase estacionária, que atuam a pressões elevadas. O equipamento utilizado foi o Hitachi® High-Performance Liquid Chromatograph LaChrom Elite, provido de uma bomba quaternária HTA L-2130, série LaChrom Elite, um autosampler L-2200, série LaChrom Elite, um desgaseificador de solventes por vácuo, em linha, incorporado e o forno de colunas L-2300, série LaChrom Elite. O detetor utilizado foi um DAD L-2455, série LaChrom. O Software EZChrom Elite, série LaChrom Elite foi utilizado para a recolha e tratamento dos dados cromatográficos.

### **6.5.1. Análise das Glutatonas por HPLC**

No método de HPLC, fez-se uma análise do *stress* oxidativo em células bacterianas, sujeitas à presença de quinoxalinas, nas concentrações de MIC, menor que MIC e sem composto.

A preparação da amostra para ser analisada em HPLC é um dos passos mais importantes para o sucesso da análise. Desta forma, e de acordo com estudos prévios, realizados no grupo de investigação<sup>201</sup> procedeu-se à preparação, por microdiluição, e incubação da amostra e ao congelamento das soluções bacterianas, na presença dos compostos em estudos, nos diferentes tempos de análise, de forma a parar a evolução do

estado de *stress* oxidativo. As soluções foram mantidas a -80°C, até ao momento da análise cromatográfica.

De forma a desproteínizar as amostras, as soluções foram sujeitas, após descongelamento, à adição do ácido trifluoroacético (TFA) seguida de uma centrifugação, a 8000 rcf, durante 20 min das quais se retiraram 100 µL de sobrenadante. A análise cromatográfica para avaliação do *stress* oxidativo foi realizada de acordo com o método descrito em Vieira, M. 2013. A fase móvel consistiu em 6L de H<sub>2</sub>O ultrapura com 0,085% de ácido fosfórico. A separação das glutationas é realizada numa coluna cromatográfica Purospher® STAR C18 de dimensões 250x4,6 mm, 5 µm. A temperatura da coluna é mantida constante a 40°C e todos os eluentes têm de ser filtrados e desgaseificados antes da sua utilização no sistema cromatográfico. A eluição dos compostos é realizada em condições isocráticas, para que a composição da fase móvel permaneça inalterada durante todo o processo, sendo que, a fase móvel é constituída por uma solução de H<sub>2</sub>O 0,085% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH=4,5), com um fluxo de 1,0 mL/min. O volume de injeção é de 20 µL, quer para os padrões quer para as amostras, com o detetor programado a 200 nm, 215 nm e 225 nm. Cada corrida efetuou-se num tempo total de 15 minutos, com três réplicas e com um intervalo de espera entre cada corrida de 1 minuto. Os padrões da GSH e GSSG foram analisados separadamente, numa primeira fase, de forma a determinar o tempo de retenção de cada um, e, posteriormente analisados em conjunto, numa mesma solução.

## 6.6. Análise estatística

A análise estatística realizou-se recorrendo aos *softwares* *Graphpad Prism* versão 6 e o *IBM SPSS statistics* versão 20. Para esta análise utilizaram-se as ferramentas de cálculo de estatística descritiva, para o cálculo de média, mediana e desvio-padrão. Utilizou-se também o teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney, devido ao tamanho da amostra ser reduzido.

## **Capítulo III:**

## **Resultados**

## 7. Atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana utilizou-se o método de microdiluição, de acordo com o CLSI M7-A7. Desta forma, foi possível verificar a atividade antibacteriana dos compostos estudados e, para aqueles em que se verificou inibição de crescimento, foram testadas concentrações de composto sucessivamente menores, de forma a ser possível determinar o valor de CMI. Todos os ensaios foram realizados, pelo menos, em triplicado.

Após a determinação do valor de CMI, foram estudadas as curvas de crescimento para avaliar a viabilidade das células bacterianas, ao longo do tempo, quando sujeitas à CMI e a uma concentração imediatamente inferior. O método de microdiluição foi utilizado para todas as estirpes e compostos com os mesmos procedimentos.

### 7.1. Determinação de CMI

De forma a observar a presença ou ausência de turvação, as placas foram incubadas 24 horas a 37°C. A presença de turvação indica que houve crescimento microbiano. A tabela 6 apresenta as CMI obtidas das quinoxalinas para as várias bactérias estudadas.

Tabela 6: Concentração mínima inibitória do composto QNX para as estirpes em estudo.

Bactéria	CMI					
	QNX (mg/mL)	Fator de diluição	2MQNX (mg/mL)	Fator de diluição	2A3CQNX (mg/mL)	Fator de diluição
<i>E.cloacae</i>	0,4	1:5	-		-	
<i>E. aerogenes</i>	0,7	1:3	1	1:2	-	
<i>E. faecalis</i>	-		-		-	
<i>S.saprophyticus</i>	-		-		-	
<i>S.enterica</i>	0,3	1:8	0,3	1:8	1	1:2
<i>K.pneumoniae</i>	0,7	1:3	1	1:2	0,4	1:5
<i>S.aureus</i>	-		-		1,4	1:1,4
<i>E.coli</i> Tem 180	-		1,7	1:1,2	-	
<i>E.coli</i> Tem 201	-		1,4	1:1,4	-	
MRSA	-		1,7	1:1,2	-	



## 7.2. Curvas de crescimento

Para a análise do comportamento das bactérias sujeitas à presença dos derivados de Quinoxalina estudados, testaram-se os valores de CMI, inferiores a CMI e ainda procedeu-se à análise da curva de crescimento sem composto, as quais foram realizadas desde o tempo 0, logo após da inoculação da bactéria na microplaca, até às 24 horas. O valor inferior de CMI apresentado nos gráficos corresponde ao fator de diluição posterior ao de CMI.

## 8. Atividade antimicrobiana do composto QNX

A QNX apresentou CMI para a *E.cloacae*, *E.aerogenes*, *K.pneumoniae* e *S.enteria*. A *E. faecalis*, *S. saprophyticus*, *S.aureus*, *E.coli* Tem 180 e *E.coli* Tem 201 e MRSA cresceram em todas as concentrações estudadas, ou seja o seu valor de CMI é  $\geq 2\text{mg/mL}$ .

### 8.1. Curvas de crescimento

#### 8.1.1. *E. cloacae*

O crescimento bacteriano da *E. cloacae* sujeita à ausência e presença de QNX apresenta-se no gráfico 1.

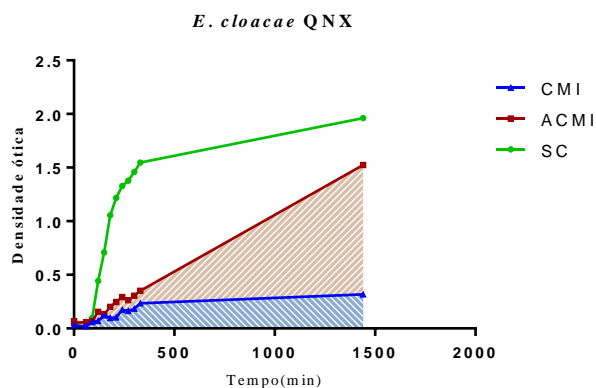


Gráfico 1. Evolução do crescimento da *E. cloacae*, ao longo do tempo, até às 24 horas, na ausência e na presença do composto QNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentração mínima inibitória): 0,2mg/mL; CMI (concentração mínima inibitória): 0,4mg/mL.

Após a análise dos resultados, evidencia-se que, ao fim de 3 horas de exposição ao composto os resultados mostram que o crescimento bacteriano da *E. cloacae* foi mais baixo em CMI do que na concentração inferior a CMI. Ao fim de 24 horas, a diferença entre a CMI e ACMI é significativa, observando-se que em CMI não houve crescimento desde as 6 horas, ao passo que ACMI cresceu progressivamente. Os resultados de comparação da variação de crescimento bacteriano ao longo do tempo, entre a amostra sem composto e a amostra ACMI, apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

De acordo com os resultados supracitados, conclui-se que a *E. cloacae* sujeita à presença de QNX não apresenta crescimento ao fim de 24 horas, ao contrário de ACMI e SC.

### 8.1.2. *E. aerogenes*

O crescimento bacteriano da *E. aerogenes* sujeita à ausência e presença de QNX apresenta-se no gráfico 2.

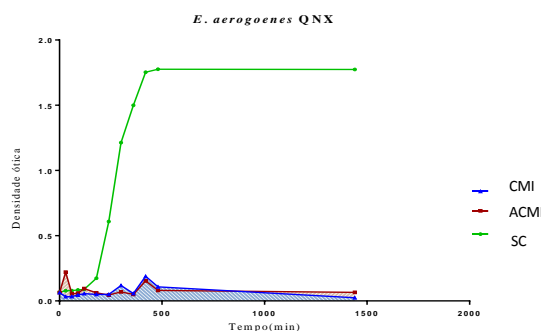


Gráfico 2. Evolução do crescimento da *E. aerogenes*, ao longo do tempo, até às 24 horas, na ausência e na presença do composto QNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentração mínima inibitória): 0,5mg/mL; CMI (concentração mínima inibitória): 0,7mg/mL.

Pela observação do gráfico anterior, verifica-se a *E. aerogenes* na ausência do composto QNX tem crescimento visivelmente mais elevado do que quando na presença de composto. O comportamento da estirpe sujeita a ACMI e CMI é muito semelhante ao longo das 24 horas. Às 24 horas verifica-se a ausência de células viáveis, à CMI, e a presença de células viáveis à ACMI. A diferença entre o crescimento bacteriano da amostra SC e ACMI é estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

### 8.1.3. *K. pneumoniae*

O crescimento bacteriano da *K. pneumoniae* sujeita à ausência e presença de QNX apresenta-se no gráfico 3.

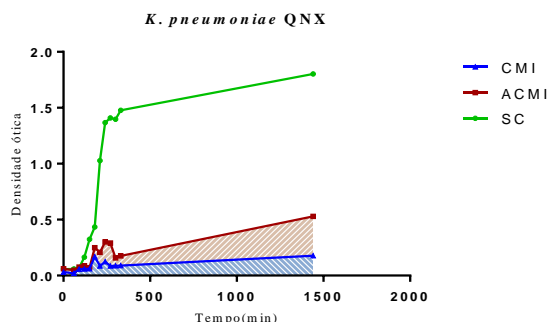


Gráfico 3. Evolução do crescimento da *K.pneumoniae*, ao longo do tempo, até às 24horas, na ausência e na presença do composto QNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentração mínima inibitória): 0,5mg/mL; CMI (concentração mínima inibitória): 0,7mg/mL.

No gráfico 3, a *K. pneumoniae* apresenta, entre as 3 e as 6 horas, crescimento gradual em ACMI E SC, o que não se verifica em CMI a partir das 3 horas. A partir das 6 horas, na CMI deixa-se de observar variação no crescimento. O inverso ocorreu em ACMI e SC nas quais se observa a continuação do crescimento bacteriano. As diferenças de crescimento bacteriano entre ACMI e SC são significativas ( $p < 0,05$ ). Desta forma, para o composto QNX, a *K.pneumoniae* não apresenta crescimento às 24 horas, na CMI de 0,7mg/mL.

### 8.1.4. *S. enterica*

O crescimento bacteriano da *S.enterica* sujeita à ausência e presença de QNX apresenta-se no gráfico 4.

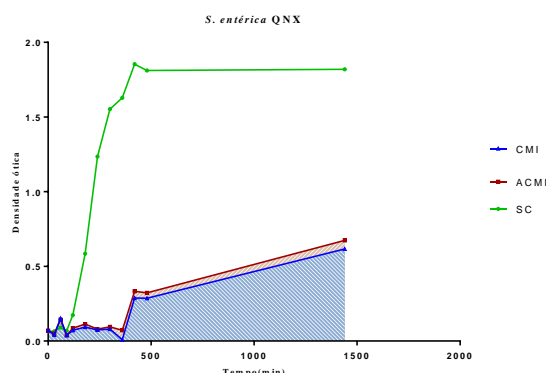


Gráfico 4. Evolução do crescimento da *S. enterica*, ao longo do tempo, até às 24 horas, na ausência e na presença do composto QNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentração mínima inibitória): 0,1mg/mL; CMI (concentração mínima inibitória): 0,3mg/mL.

Para a *S. enterica*, os resultados obtidos nas amostras de crescimento (gráfico 4) descrevem que houve crescimento e viabilidade da bactéria às 24 horas, mesmo para o valor detido nas microdiluições como CMI. Desta forma não está de acordo com a concentração de QNX ser igual à CMI. Pela análise, é demonstrado que o composto QNX inibe a *S. enterica* mas apenas nas primeiras 6 horas, nas amostras sujeitas à presença de QNX. A partir daí há um crescimento visível em CMI. Contudo, o crescimento em ACMI é significativamente inferior quando comparado com a amostra na ausência de composto ( $p < 0,05$ ).

## 9. Atividade antimicrobiana do composto 2MQNX

### 9.1. Determinação da CMI

A determinação da CMI em 2MQNX segue o mesmo método referido em QNX. Definiu-se a CMI encontrada em algumas das estirpes estudadas: *E. aerogenes*, *S. enterica*, *K. pneumoniae*, MRSA, *E. coli* Tem 201 e *E. coli* Tem 180. A CMI de cada estirpe encontra-se na tabela 6.

## 9.2. Curvas de crescimento

### 9.2.1. *K. pneumoniae*

O crescimento bacteriano da *K. pneumoniae* sujeita à ausência e presença de 2MQNX apresenta-se no gráfico 5.

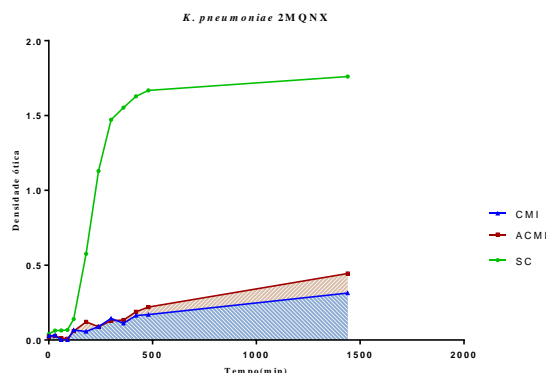


Gráfico 5. Evolução do crescimento da *K. pneumoniae*, ao longo do tempo, até às 24 horas, na ausência e na presença do composto 2MQNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentração mínima inibitória): 0,9mg/mL; CMI (concentração mínima inibitória): 1mg/mL

O comportamento da *K. pneumoniae*, nas primeiras horas, é consideravelmente mais baixo nas amostras sujeita ao composto 2MQNX do que a amostra sem composto. No entanto, as três amostras apresentam crescimento com tendência a se manter e aumentar ao longo das 24 horas. A diferença entre o SC e ACMI é estatisticamente diferente, ao fim das 24 horas ( $p < 0,05$ ).

### 9.2.2. *E. aerogenes*

O crescimento bacteriano da *E. aerogenes* sujeita à ausência e presença de 2MQNX apresenta-se no gráfico 6.

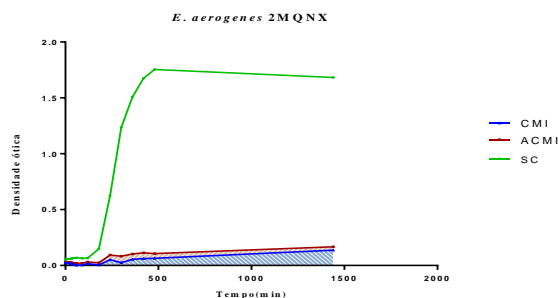


Gráfico 6. Evolução do crescimento da *E.aerogenes*, ao longo do tempo, até às 24horas, na ausência e na presença do composto 2MQNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentração mínima inibitória): 0,9mg/mL; CMI (concentração mínima inibitória): 1mg/mL

A *E.aerogenes* submetida ao composto 2MQNX apresenta baixa viabilidade celular relativamente à amostra sem composto. Esse baixo crescimento, tende a manter-se ao longo das 24 horas, para CMI e ACMI, sendo assim a diferença entre SC e ACMI significativa ( $p < 0,05$ ).

### 9.2.3. *S. enterica*

O crescimento bacteriano da *S. enterica* sujeita à ausência e presença de 2MQNX apresenta-se no gráfico 7.

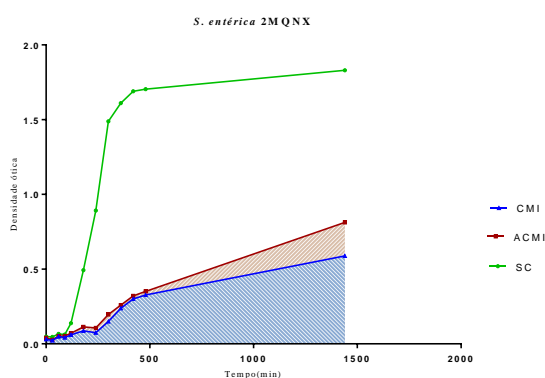


Gráfico 7. Evolução do crescimento da *S. enterica*, ao longo do tempo, até às 24horas, na ausência e na presença do composto 2MQNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentração mínima inibitória): 0,2mg/mL; CMI (concentração mínima inibitória): 0,3mg/mL.

De acordo com o gráfico 7, a *S. enterica* não apresenta crescimento até às 3 horas relativamente à amostra sem composto. No entanto a partir das 3 horas o crescimento é considerável tanto em ACMI e CMI. Apesar da CMI estar visivelmente inferior de ACMI a

sua viabilidade celular é elevada às 24 horas, o que não se verificou nas microdiluições anteriores, na concentração de 0,2mg/mL. No entanto, existe diferença significativa entre ACMI e SC o que significa que o crescimento bacteriano em ACMI é significativamente mais baixo do que em SC ( $p < 0,05$ ).

#### 9.2.4. *E. coli* Tem 201

O crescimento bacteriano da *E. coli* Tem 201 sujeita à ausência e presença de 2MQNX apresenta-se no gráfico 8.

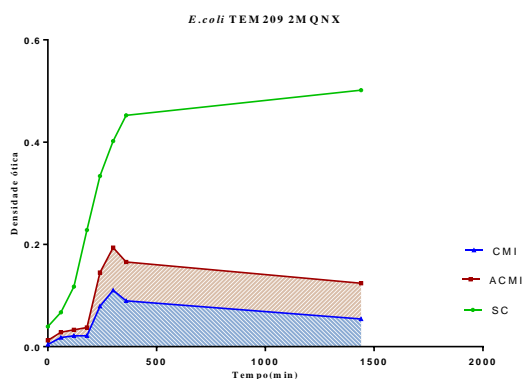


Gráfico 8. Evolução do crescimento da *E. coli* Tem 201, ao longo do tempo, até às 24 horas, na ausência e na presença do composto 2MQNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentração mínima inibitória): 1,2 mg/mL; CMI (concentração mínima inibitória): 1,4 mg/mL

A *E. coli* Tem201, submetida à presença do composto 2MQNX, apresenta um crescimento mais acentuado entre as 3 e as 5 horas para as 3 amostras. No entanto, a partir das 5 a sua tendência foi decrescente o que se confirmou às 24 horas, tanto para CMI como para ACMI. Pela observação do gráfico, conclui-se que seria interessante ver esta estirpe novamente mas num intervalo de tempo maior, como 48 horas, pois a sua tendência é para 0, às 24 horas. A comparação do crescimento bacteriano entre ACMI e SC conclui que são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

#### 9.2.4. *E. coli* Tem 180

O crescimento bacteriano da *E. coli* Tem 180 sujeita à ausência e presença de 2MQNX apresenta-se no gráfico 9.

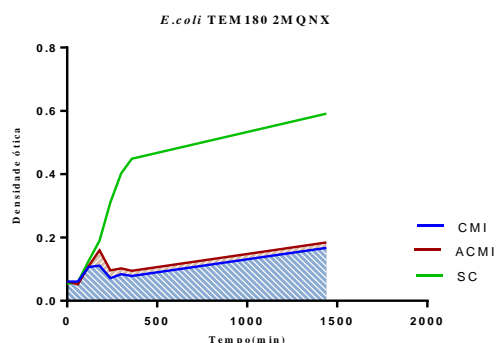


Gráfico 9. Evolução do crescimento da *E. coli* Tem 180, ao longo do tempo, até às 24 horas, na ausência e na presença do composto 2MQNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentração mínima inibitória): 1,5mg/mL; CMI (concentração mínima inibitória): 1,7mg/mL.

Na *E. coli* Tem 180 sujeita à presença de 2MQNX, o crescimento mantém-se constante até às 6 horas, havendo um pico entre as 3 e as 5 horas, e mantém a viabilidade das células às 24 horas, em todas as amostras. Estes dados não coincidem com as microdiluições anteriores, em que na concentração de 1,7mg/mL a estirpe não obteve crescimento. Contudo, a diferença de crescimento bacteriano é significativamente mais baixo em ACMI e SC ( $p < 0,05$ ).

### 9.2.5. MRSA

O crescimento bacteriano da MRSA sujeita à ausência e presença de 2MQNX apresenta-se no gráfico 10.

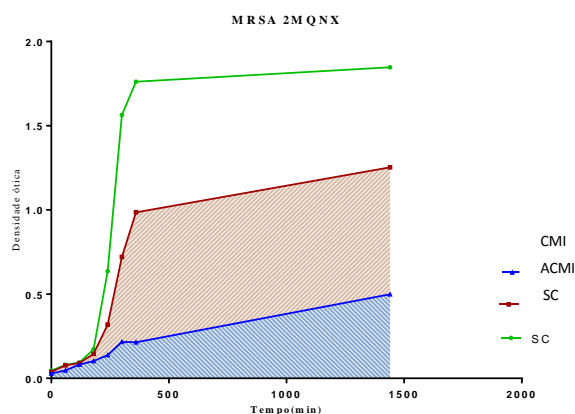


Gráfico 10. Evolução do crescimento da MRSA, ao longo do tempo, até às 24 horas, na ausência e na presença do composto 2MQNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentração mínima inibitória): 1,4 mg/mL; CMI (concentração mínima inibitória): 1,7mg/mL.



A MRSA, até às duas horas, não exibe crescimento. No entanto, começa a crescer consideravelmente entre as 2 e as 6 horas em ACMI e CMI, sendo mais pequena avariação de crescimento na CMI. Ao fim das 24 horas, não há tendência do crescimento bacteriano para zero de nenhuma das três amostras. A diferença do crescimento entre ACMI e SC é significativa, significando que o crescimento de ACMI é significativamente mais baixo que SC ( $p < 0,05$ ).

## **10. Atividade antimicrobiana do composto 2A3CQNX**

### **10.1. Determinação da CMI**

A determinação da CMI em 2A3CQNX segue o mesmo método referido em QNX e 2MQNX. Desta forma, para a observação do crescimento bacteriano ou a sua inibição respetivamente, as placas foram incubadas 24h. A tabela 6 apresenta a CMI encontrada em algumas das estirpes estudadas: *S. enterica*, *K. pneumoniae* e *S. aureus*.

### **10.2. Curvas de crescimento**

#### **10.2.1. *K. pneumoniae***

O crescimento bacteriano da *K. pneumoniae* sujeita à ausência e presença de 2A3CQNX apresenta-se no gráfico 11.

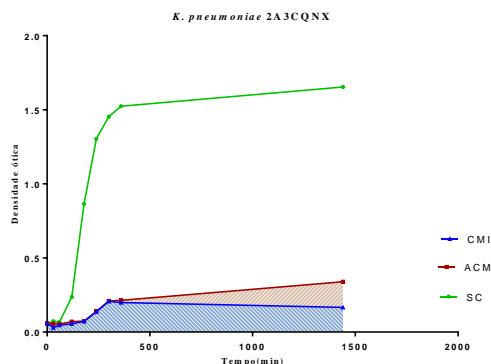


Gráfico 11. Evolução do crescimento da *K. pneumoniae*, ao longo do tempo, até às 24 horas, na ausência e na presença do composto 2A3CQNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentração mínima inibitória): 0,3mg/mL; CMI (concentração mínima inibitória): 0,4mg/mL.

A *K. pneumoniae*, na presença de 2A3CQNX, denota crescimento bacteriano entre as 3 e as 5 horas. Contudo, ao fim das 24 horas, há diminuição do crescimento em CMI, a tender para a inibição do crescimento. O contrário acontece com ACMI e SC em que a sua tendência é de crescimento bacteriano, mesmo ao fim das 24 horas. A inibição do crescimento bacteriano denota-se significativo em ACMI comparativamente a SC ( $p < 0,05$ ).

### 10.2.2. *S. enterica*

O crescimento bacteriano da *S. enterica* sujeita à ausência e presença de 2A3CQNX apresenta-se no gráfico 12.

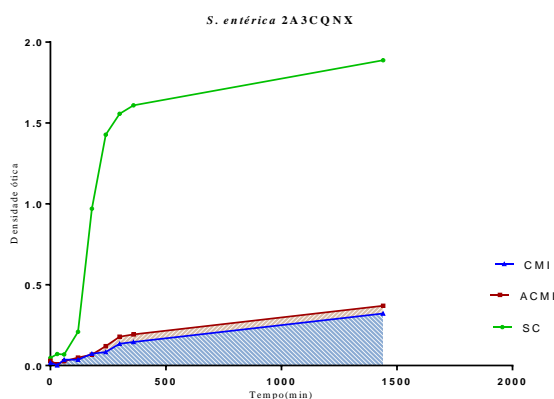


Gráfico 12. Evolução do crescimento da *S. enterica*, ao longo do tempo, até às 24 horas, na ausência e na presença do composto 2A3CQNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentração mínima inibitória): 0,9mg/mL; CMI (concentração mínima inibitória): 1mg/mL

De acordo com os dados do gráfico 12, na *S. enterica*, os resultados obtidos na CMI descrevem que existiu crescimento da bactéria e viabilidade ao fim das 24 horas, o que não é concordante com a CMI do composto 2A3CQNX tendo em conta os resultados obtidos na microdiluição. A ACMI é significativamente mais baixa que a SC ( $p < 0,05$ ).

### 10.2.3. *S. aureus*

O crescimento bacteriano da *S. aureus* sujeita à ausência e presença de 2A3CQNX apresenta-se no gráfico 13.

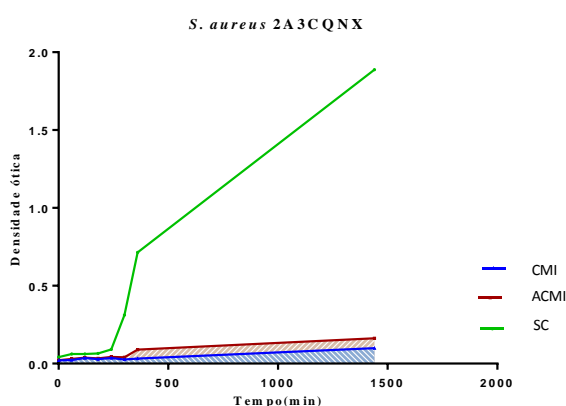


Gráfico 13. Evolução do crescimento da *S. aureus*, ao longo do tempo, até às 24 horas, na ausência e na presença do composto 2A3CQNX. SC (Sem composto); AMIC (abaixo da concentração mínima inibitória): 1,1 mg/mL; CMI (concentração mínima inibitória): 1,4 mg/mL

A *S. aureus*, apresentada no gráfico 13, não apresenta crescimento até às 6 horas em CMI, denotando-se um ligeiro crescimento da bactéria a partir das 5 horas em ACMI. Às 24 horas a CMI demonstra uma ligeira viabilidade da bactéria comparativa às primeiras 6 horas. O mesmo acontece em ACMI, na qual se verifica a presença de células viáveis. Em ACMI o crescimento da bactéria é significativamente mais baixo do que em SC ( $p < 0,05$ ).

## 11. Atividade antimicrobiana do composto 2M3BQNX

Nas microdiluições, o composto 2M3BQNX apresentou turvação em todas as concentrações possíveis com a solução de 2mg/mL: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6 e 1.7 mg/mL. Isto significa que não apresentou atividade antimicrobiana, havendo crescimento

bacteriano em todos os poços. Desta forma, não se passou para o passo seguinte, as curvas de crescimento.

## 12. Análise do rácio das glutatonas

### 12.1. Variação do estado oxidativo ao longo do tempo

O rácio da GSH/GSSG foi analisado para se compreender o seu comportamento na ausência e presença do composto. Escolheram-se as estirpes *K.pneumoniae*, *S.enterica* e *E.aerogenes* devido a terem sido as estirpes em que mais compostos apresentaram atividade antimicrobiana. Numa primeira fase da análise, aplicou-se um raciocínio (Eq.5) de forma a prever a variação do estado redox (GSH/GSSG) entre o tempo 0 e as 24 horas, em que Ri é o rácio inicial e o Rf é rácio final de glutatonas, para cada par composto/estirpe.

$$\Delta Ri-Rf: \text{oxidante} < 0 < \text{antioxidante}, \quad (5)$$

se  $(Ri-Rf) > 0 \rightarrow \text{oxidante}$ ; Se  $(Ri-Rf) < 0 \rightarrow \text{antioxidante}$ .

Posteriormente, esquematizou-se a variação, ao longo do tempo, do comportamento do par composto/estirpe, a qual é descrita na Figura 9.

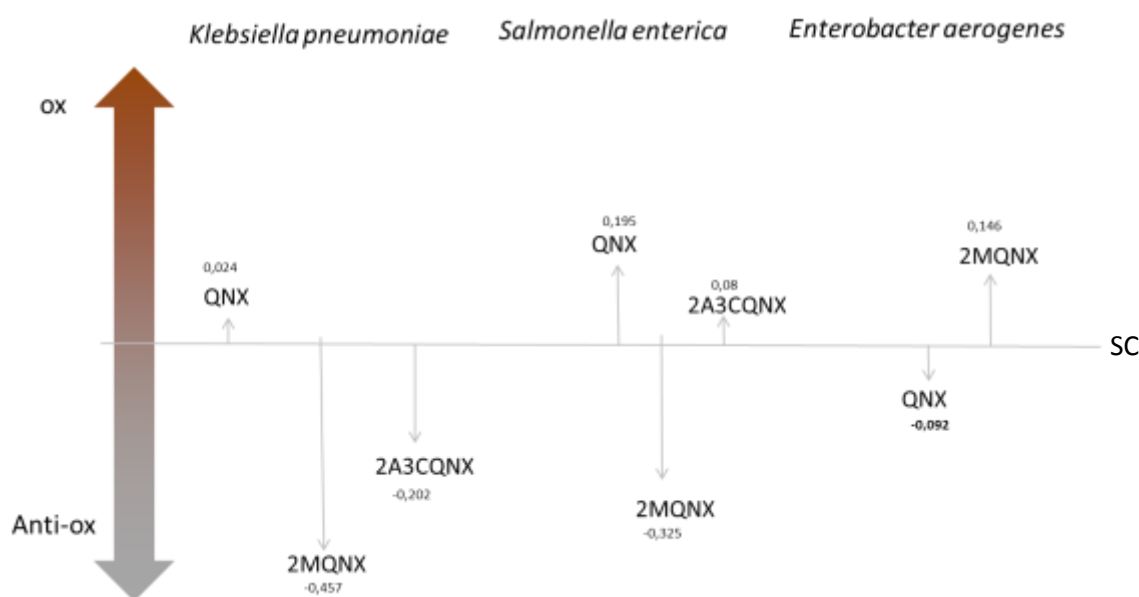


Figura 9: Representação da diferença, entre as 0 e as 24 horas, dos rácios GSH/GSSG da *K pneumoniae*, *S. enterica* e *E. aerogenes* na presença dos compostos QNX, 2MQNX e 2A3CQNX. SC: sem composto.

Como apresentado na figura 9, a *K. pneumoniae* e a *S. enterica* apresentaram rácios de glutatonas positivas para o composto QNX, o que significou um efeito oxidante na

presença de QNX. O mesmo não se verificou em *E. aerogenes*, a qual apresentou um rácio negativo, ou seja na presença de QNX mostrou um efeito antioxidante. Quanto ao composto 2MQNX, tanto a *K. pneumoniae* como a *S. enterica* sujeitas à presença desse composto, apresentaram um rácio negativo, o que significou efeito antioxidante das quinoxalinas nas bactérias supracitadas. Ao contrário do que aconteceu com a *E. aerogenes*, o qual apresentou o maior rácio na presença de 2MQNX. No composto 2A3CQNX, verificou-se um rácio negativo, ou seja, um efeito antioxidante do composto na *K. pneumoniae* e um rácio positivo de glutatonas em *S. enterica*, um efeito oxidante. Na tabela 7 é apresentada a variação dos rácios entre o tempo inicial e o tempo final, da *K.pneumoniae*, assim como as suas medianas e desvios padrões.

Tabela 7. Comparação dos rácios de glutatonas da *E. aerogenes* na ausência e presença de derivados das quinoxalinas.

		$\bar{x};\sigma$ Ri	$\bar{x};\sigma$ Rf	$\Delta$ Ri-Rf
<i>E. aerogenes</i> (SC)		0,126; 0,040	0,153; 0,07	0,310
<b>QNX</b>	<i>E. aerogenes</i> (CMI)	0,250; 0,089	0,223; 0,113	-0,092
<b>2MQNX</b>	<i>E. aerogenes</i> (CMI)	0,206; 0,027	0,151; 0,012	0,146

Ri: Rácio GSH/GSSG inicial, às 0 horas; Rf: Rácio GSH/GSSG final, às 24 horas.  
CMI: Concentração mínima inibitória; SC: Sem composto

Na tabela 7, observou-se que a *E. aerogenes* submetida submetido à presença do composto 2MQNX apresentou efeito oxidante, acontecendo o inverso na amostra submetida ao composto QNX. Na *E. aerogenes* submetida a QNX e 2MQNX as medianas foram mais elevadas na hora 0 (Ri) do que às 24 horas (Rf), o que demonstrou que os seus rácios diminuiram durante as 24 horas. A *E.aerogenes* submetida à presença de QNX apresentou um elevado desvio padrão, ou seja, elevada dispersão dos ensaios, às 24 horas.

A tabela 8 apresenta a variação entre o tempo inicial e final dos rácios das glutatonas, da *S. enterica*, assim como as suas medianas e desvios padrões.

Tabela 8. Comparação dos rácios de glutathionas da *S. enterica* na ausência e presença de derivados das quinoxalinas.

		$\tilde{x};\sigma$ <b>Ri</b>	$\tilde{x};\sigma$ <b>Rf</b>	$\Delta$ <b>Ri-Rf</b>
	<i>S. enterica</i> (SC)	0,215; 0,008	0,416; 0,141	0,19
<b>QNX</b>	<i>S. enterica</i> (CMI)	0,105; 0,017	0,107; 0,016	0,195
<b>2MQNX</b>	<i>S. enterica</i> (CMI)	0,287; 0,090	0,089; 0,122	-0,325
<b>2A3CQNX</b>	<i>S. enterica</i> (CMI)	0,145; 0,020	0,237; 0,056	0,08

Ri: Rácio GSH/GSSG inicial, às 0 horas; Rf: Rácio GSH/GSSG final, às 24 horas.

CMI: Concentração mínima inibitória; SC: Sem composto

Na tabela 8, na *S. enterica* submetida ao composto 2MQNX, observou-se efeito antioxidante. O contrário verificou-se para o composto 2A3CQNX e QNX, nos quais obteve efeito oxidante, sendo esse efeito mais elevado em QNX. A amostra sem composto e a *S. enterica* submetida à presença de 2MQNX mostra um elevado desvio padrão no tempo final, o que demonstra uma grande dispersão dos dados dos ensaios.

A tabela 9 apresenta a variação entre o tempo inicial e final dos rácios das glutathionas, da *K. pneumoniae*, assim como as suas medianas e desvios padrões.

Tabela 9. Comparação dos rácios de glutatonas da *K. pneumoniae*.

		$\tilde{x};\sigma$ <b>Ri</b>	$\tilde{x};\sigma$ <b>Rf</b>	$\Delta$ <b>Ri-Rf</b>
	<i>K. Pneumoniae</i> (SC)	0,192; 0,004	0,169; 0,034	0,22
<b>QNX</b>	<i>K. pneumoniae</i> (CMI)	0,131; 0,004	0,309; 0,096	0,25
<b>2MQNX</b>	<i>K. pneumoniae</i> (CMI)	0,142; 0,058	0,192; 0,075	-0,457
<b>2A3CQNX</b>	<i>K. pneumoniae</i> (CMI)	0,222; 0,018	0,164; 0,029	0,024

Ri: Rácio GSH/GSSG inicial, às 0 horas; Rf: Rácio GSH/GSSG final, às 24 horas.

CMI: Concentração mínima inibitória; SC: Sem composto

De acordo com a tabela 9, a *K. pneumoniae*, quando sujeita à presença do composto 2MQNX, mostrou um efeito antioxidante considerável. Nas amostras de *K. pneumoniae* sujeitas aos compostos QNX e 2A3CQNX observou-se um efeito oxidante o qual foi mais notório no composto QNX.



## **Capítulo IV:**

## **Discussão e conclusão**

## 13. Discussão/Conclusão

No presente estudo, pretendeu-se, numa primeira fase de estudo, determinar a atividade antimicrobiana dos derivados de quinoxalinas em estirpes sensíveis e resistentes. Seguidamente, procedeu-se à determinação da CMI para os compostos que inibiram o crescimento de cada estirpe. Numa segunda fase de estudo, avaliou-se a modelação do *stress* oxidativo pela presença dos compostos derivados da quinoxalina, apenas para as estirpes sensíveis aos mesmos, não tendo havido tempo útil para realizar estes ensaios em todas as estirpes avaliadas na primeira fase do estudo.

### 13.1. Determinação da atividade antimicrobiana dos derivados de QNX

Os compostos estudados apresentam atividade antimicrobiana para todas as estirpes exceto contra a *S. saprophyticus* e *E. faecalis*. Como a *S. saprophyticus* é Gram-positiva pode ter algumas resistências naturais, tal como apresenta para a novibiocina e fosfomicina, que estejam a influenciar o resultado nos presentes compostos em estudo<sup>214</sup>. Isto significa que pode existir algum mecanismo nestas bactérias que lhes permita sobreviver mesmo em elevadas doses dos compostos derivados das quinoxalinas. Estudos anteriores mostram que outras estirpes já sofrem alguma resistência ao QNX através da adaptação ao *stress* gerado pela QNX ou pelo desenvolvimento de resistência específica a QNX<sup>215</sup>.

Comparando as estirpes sensíveis estudadas, os compostos apresentaram resposta antibacteriana para as estirpes Gram-negativas e não apresentaram a mesma para todas as Gram-positivas, *S. saprophyticus* e *E. faecalis*, já referidas. Visto que as quinoxalinas são análogas das quinolonas, o seu mecanismo de ação poderá ser semelhante. No entanto, este dado não é ainda conhecido, o que torna difícil viabilizar a relação entre a estrutura e a atividade dos compostos. Nas estirpes estudadas, sem fatores de resistência, para as Gram-positivas a atividade antibacteriana não foi preponderante, ao contrário do que se verificou nas Gram-negativas. O mesmo padrão não se encontra entre as estirpes com fatores de resistência, havendo a inibição tanto das Gram-negativas como positivas, pelo 2MQNX.

As mesmas quinoxalinas já mostraram atividade antibacteriana em estirpes de *E.coli*, com e sem fatores de resistência<sup>5,201</sup>.

Quanto ao composto 2M3BQNX, estudos anteriores mostram que as quinoxalinas associadas a grupos benzilo não demonstraram atividade antimicrobiana <sup>5</sup>. A ausência de atividade pode acontecer pela estrutura química, tanto pela presença do benzilo como pela conjugação com o grupo metilo.

### 13.2. Determinação da CMI

Na determinação dos valores de CMI, não foram estudadas concentrações superiores a 1,7mg/mL, sendo o solvente da diluição água ultrapura. Estudos anteriores identificaram níveis elevados de toxicidade, para uso na terapêutica humana, em células do fígado a partir de 1mg/mL <sup>201</sup>. Valores de CMI acima de 1 mg/mL podem ter potencial aplicação em produtos industriais, como desinfetantes ou detergentes antibacterianos.

As concentrações foram testadas com uma diferença de 0,05mg/mL para ser possível a obtenção da CMI mais rigorosa possível. Importa referir as réplicas realizadas para corroborar os vários dados obtidos. O composto que apresentou as CMI mais baixas foi o QNX, para todas as estirpes estudadas, mas o 2MQNX foi o que apresentou atividade antibacteriana para o maior número de estirpes, incluindo estirpes com fatores de resistência.

### 13.3. Curvas de crescimento

A maioria das estirpes apresentou inibição do crescimento bacteriano em CMI e aumento do crescimento em ACMI. No entanto, apesar de, nas várias réplicas do estudo com *S.enterica* se ter obtido CMI em QNX, 2MQNX e 2A3CQNX, nos gráficos das curvas de crescimento verifica-se crescimento bacteriano, a partir das 4 horas. Visto que o mesmo acontece nos três compostos, é possível que estejamos perante uma situação de persistência bacteriana. Investigações precedentes demonstram que algumas subespécies da *S.enterica* têm persistência a vários agentes ambientais e antibacterianos, devido a alterações epigenéticas<sup>216-219</sup>. Relativamente ao crescimento, este comportamento verifica-se, também, na MRSA e na *E.coli* TEM 180, também a partir aproximadamente das 4 horas. Visto que ambas as estirpes são resistentes, o crescimento pode dever-se a mecanismos de resistência associados aos compostos em uso. Ainda assim, verificam-se diferenças significativas nas

curvas de crescimento entre os ensaios com e sem composto antibacteriano, para a mesma estirpe.

### 13.4. Estudo do rácio GSH/GSSG

Relativamente aos rácios das glutationas, importa referir que os ensaios realizados foram em pequeno número devido a limitações de tempo, o que influencia o valor de *p*, obtido na análise dos resultados.

Da análise dos resultados e de acordo com a figura 9, verificou-se que para as estirpes *S. enterica* e *K. pneumoniae*, a 2MQNX provocou uma resposta antioxidante por parte da bactéria, e uma resposta oxidante em *E. aerogenes*, tendo em conta a diferença dos rácios entre o tempo inicial e final. Curiosamente, este é o composto que apresenta atividade antimicrobiana para um maior número de estirpes, incluindo as resistentes. Verificou-se os resultados inversos em QNX, que provoca uma resposta oxidante na *S. enterica* e *K. pneumoniae* e uma despoletou uma resposta antioxidante na *E. aerogenes*. Quanto ao 2A3CQNX, este despoletou uma resposta antioxidante na *K. pneumoniae* e uma resposta oxidante na *S. enterica* devido a não haver estudos anteriores que suportem ou refutem esta informação, são necessários mais ensaios para se compreender melhor o porquê dos efeitos supracitados.

Contudo, importa também referir que, de acordo com estudos precedentes, não foi possível, para bactérias Gram-positivas, identificar a presença de GSH<sup>220,221</sup>. Nos ensaios realizados neste trabalho, e por aplicação do método cromatográfico desenvolvido anteriormente pelo grupo de investigação<sup>201</sup> foi possível, não só identificar a presença de GSH, como também fazer a sua quantificação. No entanto, ainda não se consegue definir um mecanismo de ação na modulação redox das quinoxalinas nas bactérias, sendo necessários mais dados posteriores.

Em resumo, este estudo permitiu conhecer a atividade antimicrobiana de compostos químicos derivados da quinoxalina 1,4-dióxido para estirpes Gram-positivas e Gram-negativas, com e sem fatores de resistência, dando continuidade a estudos do grupo de investigação, com resultados que sugerem a sua capacidade como uma terapêutica alternativa no tratamento a infeções causadas por bactérias. Permitiu também avaliar a

influência destes compostos na modulação do equilíbrio redox das bactérias, através da mediação do rácio GSH/GSSG.

#### **14. Perspetivas futuras**

Considera-se importante perceber, futuramente, o mecanismo de ação das quinoxalinas estudadas com atividade antimicrobiana nas bactérias, em modelos eucariotas e linhas celulares. Importa também estudar se a sua concentração efetiva diminui com um intervalo de tempo maior e se as bactérias criam algum tipo de resistência ou tolerância quando expostas várias vezes a esses, tanto na CMI como noutras concentrações superiores a CMI.

Na análise do rácio das glutathionas, realizou-se o estudo para três estirpes que apresentaram CMI, o que se deveu à falta de tempo útil para o realizar. Desta forma, torna-se importante estudar futuramente o funcionamento do equilíbrio redox nas estirpes *S. aureus*, *E. cloacae*, MRSA, *E. coli* TEM 180 e *E. coli* TEM 201. Nas estirpes estudadas, são cruciais novos testes com mais amostras para analisar se há normalidade e significância nas diferenças dos rácios.



## **Referências bibliográficas**

1. Potey LC, Hadke MA. Synthesis and antimicrobial activity of quinoxaline sulfonamide. *Int J Adv Res Technol.* 2013;2(12):126-134.
2. Elhelby AA, Ayyad RR, Zayed MF. Synthesis and biological evaluation of some novel quinoxaline derivatives as anticonvulsant agents. *Arzneimittelforschung.* 2011;61(7):379-381.
3. Deepika Y, Nath PS, Sachin K, Shewta S. Review Article Biological Activity of Quinoxaline Derivatives. 2011;1(3).
4. Sajjadifar S, Ali Zolfigol M, Ahmad Mirshokraie S, et al. Facile Method of Quinoxaline Synthesis Using Phenol as a New, Efficient and Cheap Catalyst at Room Temperature. *Am J Org Chem.* 2012;2(4):97-104. doi:10.5923/j.ajoc.20120204.04.
5. Vieira M, Pinheiro C, Fernandes R, Noronha JP, Prudêncio C. Antimicrobial activity of quinoxaline 1,4-dioxide with 2- and 3-substituted derivatives. *Microbiol Res.* 2014;169(4):287-293. doi:10.1016/j.micres.2013.06.015.
6. Garbati MA, Godhair AI Al. The growing resistance of *Klebsiella pneumoniae*; the need to expand our antibiogram: Case report and review of the literature. *J Infect Dis.* 2013;7(1):8-10.
7. Henen M a., El Bialy S a. a., Goda FE, Nasr MN a., Eisa HM. [1,2,4]Triazolo[4,3-a]quinoxaline: synthesis, antiviral, and antimicrobial activities. *Med Chem Res.* 2011;21(9):2368-2378. doi:10.1007/s00044-011-9753-7.
8. Mutch PJ, Dear GJ, Ismail IM. Formation of a defluorinated metabolite of a quinoxaline antiviral drug catalysed by human cytochrome P450 1A2. *J Pharm Pharmacol.* 2001;53(3):403-8.
9. Pawar PY, Bhise SB, Rindhe SS, Mane RA. Synthesis of Substituted Sulphaquinoxalinones as Anti-*Mycobacterium tuberculosis* agents . 2009;1(2):252-255.
10. Rao GK, Road H, Lalbagh N, Gate M, Gate LM. In-vitro screening of quinoxaline-2-one derivatives for antitubercular activity. *J Chem Pharm Res.* 2010;2(3):368-373.
11. Ramalakshmi N, Sidhayae R, Arunkumar S, Nalini CN. Synthesis , Antitubercular Activity of Novel Quinoxaline. *Int J Chem Stud.* 2013;1(3):20-27.
12. Radwan A a, Abdel-Mageed WM. In silico studies of quinoxaline-2-carboxamide 1,4-di-n-oxide derivatives as antimycobacterial agents. *Molecules.* 2014;19(2):2247-60. doi:10.3390/molecules19022247.
13. Fisher MH, Lusi A, Egerton JR. Anthelmintic dihydroquinoxalino[2,3-b]quinoxalines. *J Pharm Sci.* 1977;66(9):1349-52.
14. Azqueta A, Pachón G, Cascante M, Creppy EE, López De Cerain A. DNA damage induced by a quinoxaline 1,4-di-Af-oxide derivative (hypoxic selective agent) in Caco-2 cells evaluated by the comet assay. *Mutagenesis.* 2005;20(3):165-171. doi:10.1093/mutage/gei023.
15. Ghattass K, El-Sitt S, Zibara K, et al. The quinoxaline di-N-oxide DCQ blocks breast cancer metastasis in vitro and in vivo by targeting the hypoxia inducible factor-1 pathway. *Mol Cancer.* 2014;13(1):12. doi:10.1186/1476-4598-13-12.
16. Hu Y, Xia Q, Shangguan S, Liu X, Hu Y, Sheng R. Synthesis and biological evaluation of 3-aryl-quinoxaline-2-carbonitrile 1,4-di-N-oxide derivatives as hypoxic selective anti-tumor agents. *Molecules.* 2012;17(8):9683-96. doi:10.3390/molecules17089683.



17. Myers MR, He W, Hanney B, et al. Potent quinoxaline-Based inhibitors of PDGF receptor tyrosine kinase activity. Part 1: SAR Exploration and Effective Bioisosteric Replacement of a phenyl substituent. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003;13(18):3091-3095. doi:10.1016/S0960-894X(03)00654-1.
18. Szabó G, Kiss R, Páyer-Lengyel D, et al. Hit-to-lead optimization of pyrrolo[1,2-a]quinoxalines as novel cannabinoid type 1 receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009;19(13):3471-5. doi:10.1016/j.bmcl.2009.05.010.
19. Kotra V, Pradeep K, Vasanthi R. Synthesis, characterization and pharmacological evaluation of some novel quinoxaline derived chalcones. *Pharma Chem*. 2013;5(4):301-307.
20. Antimicrobial resistance: Global Report on surveillance \_ WHO\_2014. Disponível em URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/en/>.
21. Global Strategy for Containment of Antimicrobial Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance\_WHO\_2001.
22. Waksman SA. What Is an Antibiotic or an Antibiotic Substance ? *Mycol Soc Am*. 2014;39(5):565-569.
23. Brown GM, Gene M. The Biosynthesis of Folic Acid. *J Biol CHEMISTRY*. 1962:536-540.
24. Fleming A. Penicillin. *Br Med J*. 1945.
25. Fernández L, Breidenstein EBM, Hancock REW. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resist Updat*. 2011;14(1):1-21. doi:10.1016/j.drug.2011.01.001.
26. Tanwar J, Das S, Fatima Z, Hameed S. Multidrug resistance: an emerging crisis. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2014;2014:541340. doi:10.1155/2014/541340.
27. El-Halfawy OM, Valvano M a. Putrescine Reduces Antibiotic-Induced Oxidative Stress as a Mechanism of Modulation of Antibiotic Resistance in *Burkholderia cenocepacia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(7):4162-71. doi:10.1128/AAC.02649-14.
28. Tang SS, Apisarnthanarak A, Hsu LY. Mechanisms of  $\beta$ -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014:1-11. doi:10.1016/j.addr.2014.08.003.
29. Butler MS, Blaskovich M A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *J Antibiot (Tokyo)*. 2013;66(10):571-91. doi:10.1038/ja.2013.86.
30. O'Daniel PI, Peng Z, Pi H, et al. Discovery of a new class of non- $\beta$ -lactam inhibitors of penicillin-binding proteins with Gram-positive antibacterial activity. *J Am Chem Soc*. 2014;136(9):3664-72. doi:10.1021/ja500053x.
31. Hessen MT, Kaye D. Principles of use of antibacterial agents. *Infect Dis Clin North Am*. 2004;18(3):435-50, vii. doi:10.1016/j.idc.2004.04.002.
32. Pankey G a, Sabath LD. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2004;38(6):864-70. doi:10.1086/381972.
33. Craig WA. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Parameters : Rationale for Antibacterial Dosing of Mice and Men. *Clin Infect Dis*. 1998;26(1):1-12.

34. Nuding S, Frasc T, Schaller M, Stange EF, Zabel LT. Synergistic effects of antimicrobial peptides and antibiotics against *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014. doi:10.1128/AAC.02542-14.
35. Reuk-ngam N, Chimnoi N, Khunnawutmanotham N, Techasakul S. Antimicrobial activity of coronarin D and its synergistic potential with antibiotics. *Biomed Res Int*. 2014;2014:581985. doi:10.1155/2014/581985.
36. DiCicco M, Neethirajan S, Weese JS, Singh A. In vitro synergism of fosfomycin and clarithromycin antimicrobials against methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *BMC Microbiol*. 2014;14(1):129. doi:10.1186/1471-2180-14-129.
37. Reffuveille F, Leneuve C, Chevalier S, Auffray Y, Rincé A. Lipoproteins of *Enterococcus faecalis*: bioinformatic identification, expression analysis and relation to virulence. *Microbiology*. 2011;157(11):3001-13. doi:10.1099/mic.0.053314-0.
38. Parhi AK, Zhang Y, Saionz KW, et al. Antibacterial activity of quinoxalines, quinazolines, and 1,5-naphthyridines. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(17):4968-74. doi:10.1016/j.bmcl.2013.06.048.
39. Budman, D., Calabro, A., Rosen, L., Lesser M. Identification of unique synergistic drug combinations associated with down expression of survivin in a preclinical breast cancer model system Daniel. *Anticancer Drugs*. 2013;23(3):272-279.
40. Wickerath M, Singh NP. Additive cytotoxic effects of dihydroartemisinin and sodium salicylate on cancer cells. *Anticancer Res*. 2014;34(7):3399-401.
41. Guilhelmelli F, Vilela N, Albuquerque P, Derengowski LDS, Silva-Pereira I, Kyaw CM. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol*. 2013;4:12. doi:10.3389/fmicb.2013.00353.
42. Fernandes R, Amador P, Prudêncio C.  $\beta$ -Lactams. *Rev Med Microbiol*. 2013;24(1):7-17. doi:10.1097/MRM.0b013e3283587727.
43. Reynolds PE. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1989;8(11):943-50. doi:0934-9723/89/11 0943-08.
44. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med*. 2006;119(6A):S4-10. doi:10.1016/j.amjmed.2006.03.011.
45. Best GK, Best NH, Ann V. Evidence for Participation of Autolysins in Bactericidal Action of Oxacillin on *Staphylococcus aureus* Evidence for Participation of Autolysins in Bactericidal Action of Oxacillin on *Staphylococcus aureus*. 1974;6(6):825-830. doi:10.1128/AAC.6.6.825.
46. Yocum RR, Rasmussen JR, Strominger JL. The Mechanism of Action of Penicillin. *J Biol CHEMISTRY*. 1980;255(9):3977-3986.
47. Mardh A. Penicillin-binding proteins and cell shape in *E.coli*. *Nature*. 1975;254:516-517.
48. Park, J. and Strominger J. Mode of Action of Penicillin. *Science (80- )*. 1957;125(3238):1-3.
49. Edwards, E; Epton, R; Marr G. A new class of semi-synthetic antiriotics: ferrocenyl-penicillins and -cephalosporins. *J Organomet Chemistry*. 1976;107:351-357.
50. Edwards E. Organometallic Derivatives Of Penicillins And Cephalosporins: A New Class Of Semi-Synthetic antibiotics. *J Organomet Chemistry*. 1975;85:23-25.
51. Barbara E. Murray MP. Cephalosporins. *Annu Rev Med*. 1981;32:559-581.

52. Greenwood D, Whitley R. Modes of action. In: *Antibiotic and Chemotherapy : Anti-Infective Agents and Their Use in Therapy.*; 2002:11-24.
53. Sykes, R e Bonner D. Aztreonam: the first monobactam. *Med Clin North Am.* 1988;72(3):555-66.
54. Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis.* 2011;53(1):60-7. doi:10.1093/cid/cir202.
55. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, et al. Comparative review of the carbapenems. *Drugs.* 2007;67(7):1027-52.
56. Livermore DM. Pseudomonas , porins , pumps and carbapenems. *J os Antimicrob Chemother.* 2001;47:247-250.
57. Williams JD. B-Lactamase Inhibition and In Vitro Activity of Sulbactam and Sulbactam/Cefoperazone. *Clin Infect Dis.* 1997;24(3):494-7.
58. Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D. In Vitro Activities of the  $\beta$  -Lactamase Inhibitors Clavulanic Acid , Sulbactam , and Tazobactam Alone or in Combination with  $\beta$  -Lactams against Epidemiologically Characterized Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* StrainS. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(5):1586-1592. doi:10.1128/AAC.48.5.1586–1592.2004.
59. Adam D, Visser I KP. Pharmacokinetics of amoxicillin and clavulanic acid administered alone and in combination. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982;22(3):353-7. doi:0066-4804/82/090353.
60. Thomson KS, Moland ES. Inoculum Effect in Tests with Enterobacteriaceae Cefepime , Piperacillin-Tazobactam , and the Inoculum Effect in Tests with Extended-Spectrum <sup>a</sup> -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. 2001. doi:10.1128/AAC.45.12.3548.
61. Rubinstein E, Keynan Y. Vancomycin-resistant enterococci. *Crit Care Clin.* 2013;29(4):841-52. doi:10.1016/j.ccc.2013.06.006.
62. Allen NE, Nicas TI. Mechanism of action of oritavancin and related glycopeptide antibiotics. *FEMS Microbiol Rev.* 2003;26(5):511-32. doi:1 68- 644 5(02)00 14 4- 4.
63. Bambeke F, Laethem Y, Courvalin P TP. Glycopeptide antibiotics: from conventional molecules to new derivatives. *Drugs.* 2004;64(9):913-36. doi:0012-6667/04/0009-0913.
64. Aminov RI. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol.* 2009;11(12):2970-88. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01972.x.
65. Hermann T. Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(14):1841-52. doi:10.1007/s00018-007-7034-x.
66. Davies J, Davis BD. Misreading of Ribonucleic Acid by Aminoglycoside Antibiotics. *J Biol Chemistry.* 1968;243(12):3312-2216.
67. Reijtmana V, Gagettib P, Faccone D, Fossatib S SP, Hernández E, Bernáldez P, Loparhoa H CA. Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolated from Argentinian pediatric patients suffering from acute otitis media. *Rev Argent Microbiol.* 2013;45(4):262-266.
68. Gaynor M, Mankin AS. Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance. *Curr Top Med Chem.* 2003;3(9):949-61.

69. Chopra I, Roberts M. Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001;65(2):232-260. doi:10.1128/MMBR.65.2.232.
70. Zakeri B, Wright GD. Chemical biology of tetracycline antibiotics. *Biochem Cell Biol.* 2008;86(2):124-36. doi:10.1139/O08-002.
71. Andriole VT. The quinolones: past, present, and future. *Clin Infect Dis.* 2005;41(2):113-19. doi:10.1086/428051.
72. Blondeau JM. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Surv Ophthalmol.* 2004;49 Suppl 2(March):S73-8. doi:10.1016/j.survophthal.2004.01.005.
73. Ryan RJ, Lindsell C, Sheehan P. Fluoroquinolone resistance during 2000-2005: an observational study. *BMC Infect Dis.* 2008;8:71. doi:10.1186/1471-2334-8-71.
74. Wolfson JS, Hooper DC. The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;28(4):581-6.
75. Gnida A, Kunda K, Ziemińska A, Luczkiewicz A, Felis E, Surmacz-Górska J. Detection of sulfonamide resistance genes via in situ PCR-FISH. *Polish J Microbiol.* 2014;63(2):167-73.
76. Maren TH. Relations between structure and biological activity of sulfonamides. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1976;16(1):309-27. doi:10.1146/annurev.pa.16.040176.001521.
77. Seydel J. Sulfonamides, Structure-Activity Relationship, and Mode of Action. *J Pharm Sci.* 1968;57(9):1457-1470.
78. Bigger J. Treatment of Staphylococcal Infections With Penicillin. *Lancet.* 1994;14:497-500.
79. Willenborg J, Willms D, Bertram R, Goethe R, Valentin-Weigand P. Characterization of multi-drug tolerant persister cells in *Streptococcus suis*. *BMC Microbiol.* 2014;14(1):120. doi:10.1186/1471-2180-14-120.
80. De Groote VN, Fauvart M, Kint CI, et al. *Pseudomonas aeruginosa* fosfomycin resistance mechanisms affect non-inherited fluoroquinolone tolerance. *J Med Microbiol.* 2011;60(Pt 3):329-36. doi:10.1099/jmm.0.019703-0.
81. Conlon B, Nakayasu E, Fleck L, LaFleur M, Isabella V, Coleman K, Leonard S, Smith R, Adkins J, Lewis K. Killing persister cells and eradicating a biofilm infection by activating the ClpP protease. *Nature.* 2014;503(7476):365-370. doi:10.1038/nature12790.Killing.
82. Hansen S, Lewis K, Vulić M. Role of global regulators and nucleotide metabolism in antibiotic tolerance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(8):2718-26. doi:10.1128/AAC.00144-08.
83. Costerton AJW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms : Persistent Common Cause of. *Science (80- ).* 2011;284(5418):1318-1322.
84. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med.* 2004;10(12 Suppl):S122-9. doi:10.1038/nm1145.
85. Chang EP, Chiang DH, Lin ML, Chen TL, Wang F Der, Liu CY. Clinical characteristics and predictors of mortality in patients with *Enterobacter aerogenes* bacteremia. *J Microbiol Immunol Infect.* 2009;42(4):329-35.

86. González L, Cortés JA. Revisión sistemática de la farmacorresistencia en enterobacterias de aislamientos hospitalarios en Colombia. 2014.
87. Sarin MSK, Vadivelan M, Bammigatti C. Antimicrobial Therapy in the Intensive Care Unit. 2013;23(10).
88. Alanis AJ. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res*. 2005;36(6):697-705. doi:10.1016/j.arcmed.2005.06.009.
89. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010;74(3):417-33. doi:10.1128/MMBR.00016-10.
90. Garcia-Graells C, Antoine J, Larsen J, Catry B, Skov R, Denis O. Livestock veterinarians at high risk of acquiring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398. *Epidemiol Infect*. 2012;140(3):383-9. doi:10.1017/S0950268811002263.
91. Huddleston JR. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infect Drug Resist*. 2014;7:167-76. doi:10.2147/IDR.S48820.
92. Byarugaba DK. Mechanisms of Antimicrobial Resistance. In: Sosa A de J, Byarugaba DK, Amábile-Cuevas CF, Hsueh P-R, Kariuki S, Okeke IN, eds. *Antimicrobial Resistance in Developing Countries*. New York, NY: Springer New York; 2010:15-27. doi:10.1007/978-0-387-89370-9.
93. Martínez JL, Baquero F. Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. *Ups J Med Sci*. 2014;119(2):68-77. doi:10.3109/03009734.2014.901444.
94. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis*. 2001;32(Suppl 2):S94-103. doi:10.1086/320182.
95. Jacoby GA. Extended-Spectrum B-Lactamases and Other Enzymes Provide Resistance to Oxymino-B-Lactams. *Infect Dis Clin North Am*. 1997;11(4):875-887.
96. Rupp ME, Fey PD. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs*. 2003;63(4):353-65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12558458>.
97. Kanamori H, Yano H, Hirakata Y, et al. Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamases and qnr determinants in Enterobacter species from Japan. *PLoS One*. 2012;7(6):e37967. doi:10.1371/journal.pone.0037967.
98. Villegas M V, Kattan JN, Quinteros MG, Casellas JM. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in South America. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14 Suppl 1:154-8. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01869.x.
99. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59(2):165-74. doi:10.1093/jac/dkl483.
100. Chen, C, Huang C. Risk factor analysis for extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacter cloacae bloodstream infections in central Taiwan. *BMC Infect Dis*. 2013;13(1):417. doi:10.1186/1471-2334-13-417.
101. Paterson DL. Recommendation for treatment of severe infections caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol Infect*. 2000;6(9):460-3.

102. Jacoby G a. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):161-82. doi:10.1128/CMR.00036-08.
103. Ribas RM, Freitas C, Gontijo Filho PP. Nosocomial bloodstream infections: organisms, risk factors and resistant phenotypes in the Brazilian University Hospital. *Braz J Infect Dis.* 2007;11(3):351-4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17684638>.
104. History A. Review Article An Overview of Mechanisms and Emergence of Antimicrobials Drug. 2013;1:7-14.
105. Hermann T. Drugs targeting the ribosome. *Curr Opin Struct Biol.* 2005;15(3):355-66. doi:10.1016/j.sbi.2005.05.001.
106. Poehlsgaard J, Douthwaite S. The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(11):870-81. doi:10.1038/nrmicro1265.
107. Reynolds PE, Courvalin P. Vancomycin Resistance in Enterococci Due to Synthesis of Precursors Terminating in D -Alanyl- D -Serine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(1):20-25. doi:10.1128/AAC.49.1.21.
108. Chethana GS, R HVK, Mirzaei F, Gopinath SM. Review on Multidrug Resistant Bacteria and its Implications in Medical Sciences. *J Biol Sci Opin.* 2013;1(1). doi:10.7897/2321-6328.01127.
109. Ruiz del Castillo B, Vinué L, Román EJ, et al. Molecular characterization of multiresistant *Escherichia coli* producing or not extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *BMC Microbiol.* 2013;13:84. doi:10.1186/1471-2180-13-84.
110. Dzidic S, Suskovic J KB. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria : Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technol Biotechnol.* 2008;46(1):11-21.
111. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014. doi:10.1016/j.bbrc.2014.05.090.
112. Malléa M, Chevalier J, Eyraud A, Pagès J-M. Inhibitors of antibiotic efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;293(5):1370-3. doi:10.1016/S0006-291X(02)00404-7.
113. Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell.* 2007;128(6):1037-50. doi:10.1016/j.cell.2007.03.004.
114. Orozco E, López C, Gómez C, et al. Multidrug resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Int.* 2002;51(4):353-9.
115. Gregersen T. Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.* 1978;5(2):123-127. doi:10.1007/BF00498806.
116. Lázár V, Pal Singh G, Spohn R, et al. Bacterial evolution of antibiotic hypersensitivity. *Mol Syst Biol.* 2013;9(700):700. doi:10.1038/msb.2013.57.
117. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(2):123-40. doi:10.1038/nrmicro818.
118. Szmolka A, Nagy B. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Front Microbiol.* 2013;4(September):258. doi:10.3389/fmicb.2013.00258.

119. Graffunder EM. Risk factors associated with nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection including previous use of antimicrobials. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49(6):999-1005. doi:10.1093/jac/dkf009.
120. Rybak MJ, Pharm D, Laplante KL. Community-Associated Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A review. *Pharmacotherapy.* 2005;25(1):74-85.
121. Fry DE, Barie PS. The changing face of *Staphylococcus aureus*: a continuing surgical challenge. *Surg Infect (Larchmt).* 2011;12(3):191-203. doi:10.1089/sur.2011.068.
122. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis.* 2008;46(Suppl 5):S350-9. doi:10.1086/533591.
123. S, Naimi, Ledell K, Como-Sabetti K, Borchardt S, Boxrud D, Johnson S, Fridkin S, Boyle C, Danila O, Richard N LR. Comparison of Community-and Health Care – Associated *Staphylococcus aureus* Infection. *J Am Med Assoc.* 2003;290(22):29976-84.
124. Tattevin P, Diep BA, Jula M, Perdreau-Remington F. Long-term follow-up of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* molecular epidemiology after emergence of clone USA300 in San Francisco jail populations. *J Clin Microbiol.* 2008;46(12):4056-7. doi:10.1128/JCM.01372-08.
125. Weber JT. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 2005;41(4):269-72. doi:10.1086/430788.
126. Van Rijen MML, Van Keulen PH, Kluytmans J a. Increase in a Dutch hospital of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related to animal farming. *Clin Infect Dis.* 2008;46(2):261-3. doi:10.1086/524672.
127. Coque TM, Tomayko JF, Ricke SC, Okhyusen PC, Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial , community , and animal sources in the United States . Vancomycin-Resistant Enterococci from Nosocomial , Community , and Animal Sources in the United States. 1996.
128. Service PH, Services H. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control.* 2004;32(8):470-485. doi:10.1016/j.ajic.2004.10.001.
129. Van Tyne D, Martin MJ, Gilmore MS. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins (Basel).* 2013;5(5):895-911. doi:10.3390/toxins5050895.
130. Arun V. Synthesis and Characterisation of New Transition Metal Complexes of Schiff Bases Derived From 3-Hydroxyquinoxaline-2-Carboxaldehyde and Application Of some These Complexes As Hydrogenation and Oxidation Catalysts. 2009.
131. T SMB. *Enterococcus faecalis* -An Endodontic Challenge. :0-4.
132. Dunny GM, Leonard BAB. Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis* : interbacterial and host-parasite chemical communication . MINIREVIEW Pheromone-Inducible Conjugation in *Enterococcus faecalis* : Interbacterial and Host-Parasite Chemical Communication. 1995;177(4).
133. KOCH, S., Hufnabel, M., Theilacker, C. HJ. Enterococcal Infection: Host Response, Therapeutic and Propylatic Possibilities. *Vaccine.* 2004;830:822-830.
134. Martínez J, Martínez L, Rosenblueth M, Silva J, Martínez-Romero E. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. *Int Microbiol.* 2004;7(4):261-8.

135. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(4):589-603. doi:0893-8512/98/\$04.00?0.
136. Rosenthal VD, Bijie H, Maki DG, et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004-2009. *Am J Infect Control.* 2012;40(5):396-407. doi:10.1016/j.ajic.2011.05.020.
137. Lawlor MS, Hsu J, Rick PD, Miller VL. Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. *Mol Microbiol.* 2005;58(4):1054-73. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04918.x.
138. Raz R, Colodner R, Kunin CM. Who Are You — *Staphylococcus saprophyticus*? *Clin Infect Dis.* 2005;40:896-898.
139. Korte-Berwanger M, Sakinc T, Kline K, Nielsen H V, Hultgren S, Gattermann SG. Significance of the D-serine-deaminase and D-serine metabolism of *Staphylococcus saprophyticus* for virulence. *Infect Immun.* 2013;81(12):4525-33. doi:10.1128/IAI.00599-13.
140. Mehnert-Kay S a. Diagnosis and management of uncomplicated urinary tract infections. *Am Fam Physician.* 2005;72(3):451-6.
141. Paulsson M, Ljungh A, Wadström T. Rapid identification of fibronectin, vitronectin, laminin, and collagen cell surface binding proteins on coagulase-negative staphylococci by particle agglutination assays. *J Clin Microbiol.* 1992;30(8):2006-12.
142. Sakinc T, Woznowski M, Ebsen M, Gattermann SG. The Surface-Associated Protein of *Staphylococcus saprophyticus* Is a Lipase The Surface-Associated Protein of *Staphylococcus saprophyticus* Is a Lipase. 2005;73(10). doi:10.1128/IAI.73.10.6419.
143. Kleine B, Gattermann S, Sakinc T. Genotypic and phenotypic variation among *Staphylococcus saprophyticus* from human and animal isolates. *BMC Res Notes.* 2010;3:163. doi:10.1186/1756-0500-3-163.
144. Zarrineh P, Sánchez-Rodríguez A, Hosseinkhan N, Narimani Z, Marchal K, Masoudi-Nejad A. Genome-Scale Co-Expression Network Comparison across *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Reveals Significant Conservation at the Regulon Level of Local Regulators Despite Their Dissimilar Lifestyles. *PLoS One.* 2014;9(8):e102871. doi:10.1371/journal.pone.0102871.
145. Reeves MW, Evins GM, Heiba a a, Plikaytis BD, Farmer JJ. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J Clin Microbiol.* 1989;27(2):313-20.
146. Mastroeni P, Grant AJ. Spread of *Salmonella enterica* in the body during systemic infection: unravelling host and pathogen determinants. *Expert Rev Mol Med.* 2011;13(April):e12. doi:10.1017/S1462399411001840.
147. Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Futur microbiol.* 2012;7(7):887-902.
148. Hoffmann H, Roggenkamp A. Population Genetics of the Nomenclature *Enterobacter cloacae* Population Genetics of the Nomenclature *Enterobacter cloacae*. 2003;69(9). doi:10.1128/AEM.69.9.5306.
149. Kim S-M, Lee H-W, Choi Y-W, et al. Involvement of curli fimbriae in the biofilm formation of *Enterobacter cloacae*. *J Microbiol.* 2012;50(1):175-8. doi:10.1007/s12275-012-2044-2.



150. Zogaj X, Bokranz W, Nimtz M, Ro U. Production of Cellulose and Curli Fimbriae by Members of the Family Enterobacteriaceae Isolated from the Human Gastrointestinal Tract Production of Cellulose and Curli Fimbriae by Members of the Family Enterobacteriaceae Isolated from the Human Gastroint. 2003. doi:10.1128/IAI.71.7.4151.
151. Fernández A, Pereira MJ, Suárez JM, et al. Emergence in Spain of a multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* clinical isolate producing SFO-1 extended-spectrum beta-lactamase. *J Clin Microbiol.* 2011;49(3):822-8. doi:10.1128/JCM.01872-10.
152. Jiang X, Ni Y, Jiang Y, et al. Outbreak of Infection Caused by *Enterobacter cloacae* Producing the Novel Outbreak of Infection Caused by *Enterobacter cloacae* Producing the Novel VEB-3 Beta-Lactamase in China. 2005. doi:10.1128/JCM.43.2.826.
153. Blot SI, Vandewoude KH, Colardyn F a. Evaluation of outcome in critically ill patients with nosocomial enterobacter bacteremia: results of a matched cohort study. *Chest.* 2003;123(4):1208-13.
154. Davin-Regli a, Monnet D, Saux P, et al. Molecular epidemiology of *Enterobacter aerogenes* acquisition: one-year prospective study in two intensive care units. *J Clin Microbiol.* 1996;34(6):1474-80.
155. Thiolas A, Bollet C, La Scola B, Raoult D, Pagès J-M. Successive emergence of *Enterobacter aerogenes* strains resistant to imipenem and colistin in a patient. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(4):1354-8. doi:10.1128/AAC.49.4.1354-1358.2005.
156. Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;295(4):C849-68. doi:10.1152/ajpcell.00283.2008.
157. Von Moos N, Slaveykova VI. Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae--state of the art and knowledge gaps. *Nanotoxicology.* 2014;8(6):605-30. doi:10.3109/17435390.2013.809810.
158. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95. doi:10.1152/physrev.00018.2001.
159. Nakagawa T, Sato W, Kosugi T, Johnson RJ. Uncoupling of VEGF with endothelial NO as a potential mechanism for abnormal angiogenesis in the diabetic nephropathy. *J Diabetes Res.* 2013;7. doi:10.1155/2013/184539.
160. Ballinger SW. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med.* 2005;38(10):1278-95. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.014.
161. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 2006;97(6):1634-58. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x.
162. Dai D-F, Chiao YA, Marcinek DJ, Szeto HH, Rabinovitch PS. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. *Longev Heal.* 2014;3(1):22. doi:10.1186/2046-2395-3-6.
163. Hassett DJ, Cohen S, Carolina N. Bacterial adaptation to oxidative stress : and cells implications interaction for pathogenesis with phagocytic. *FASEB J.* 1989;3.
164. Grant SS, Hung DT. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence.* 2013;4(4):273-83. doi:10.4161/viru.23987.
165. Wang X, Zhao X. Contribution of oxidative damage to antimicrobial lethality. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(4):1395-402. doi:10.1128/AAC.01087-08.

166. Imlay YL and JA. Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science*. 2013;339(6124):1210-1213. doi:10.1126/science.1232751.Cell.
167. Paraje MG, Barnes AI, Albesa I. An *Enterobacter cloacae* toxin able to generate oxidative stress and to provoke dose-dependent lysis of leukocytes. *Int J Med Microbiol*. 2005;295(2):109-16. doi:10.1016/j.ijmm.2004.12.010.
168. Rahal A, Kumar A, Singh V, et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int*. 2014;2014:761264. doi:10.1155/2014/761264.
169. Noori S. An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. *J Clin Cell Immunol*. 2012;01(08):1-9. doi:10.4172/scientificreports.413.
170. Kunwar A PK. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *J Med Allied Sci*. 2011;1(2):53-60.
171. Letters MB. The Markers of Oxidative Stress and Activity of the Antioxidant System in the Blood of Elderly Patients with Essential Arterial Hypertension. *Cell Mol Biol*. 2004;9(April):635-641.
172. Shimizu K. Regulation Systems of Bacteria such as *Escherichia coli* in Response to Nutrient Limitation and Environmental Stresses. *Metabolites*. 2013;4(1):1-35. doi:10.3390/metabo4010001.
173. Vorbach C, Harrison R, Capecchi MR. Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends Immunol*. 2003;24(9):512-517. doi:10.1016/S1471-4906(03)00237-0.
174. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*. 2005;77(5):598-625. doi:10.1189/jlb.1204697.
175. Leininger GM, Edwards JL, Lipshaw MJ, Feldman EL. Mechanisms of disease: mitochondria as new therapeutic targets in diabetic neuropathy. *Nat Clin Pract Neurol*. 2006;2(11):620-8. doi:10.1038/ncpneuro0320.
176. Ferreira B, Mendes F, Osório N, Caseiro A, Gabriel A, Valado A. Glutathione in multiple sclerosis. *Br J Biomed Sci*. 2013;70(2):75-9.
177. Johnson WM, Wilson-Delfosse AL, Mieyal JJ. Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. *Nutrients*. 2012;4(10):1399-440. doi:10.3390/nu4101399.
178. Anderson ME. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact*. 1998;111-112:1-14.
179. Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and Glutathione-dependent Enzymes Represent a Co-ordinately Regulated Defence Against Oxidative Stress JOHN. *Free Rad*. 1999;31:273-300.
180. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Asp Med*. 2010;30:1-12. doi:10.1016/j.mam.2008.08.006.Glutathione.
181. Chen Y, Shertzer HG, Schneider SN, Nebert DW, Dalton TP. Glutamate cysteine ligase catalysis: dependence on ATP and modifier subunit for regulation of tissue glutathione levels. *J Biol Chem*. 2005;280(40):33766-74. doi:10.1074/jbc.M504604200.
182. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*. 2003;333(1):19-39. doi:10.1016/S0009-8981(03)00200-6.
183. Appenzeller-Herzog C. Glutathione- and non-glutathione-based oxidant control in the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 6):847-55. doi:10.1242/jcs.080895.

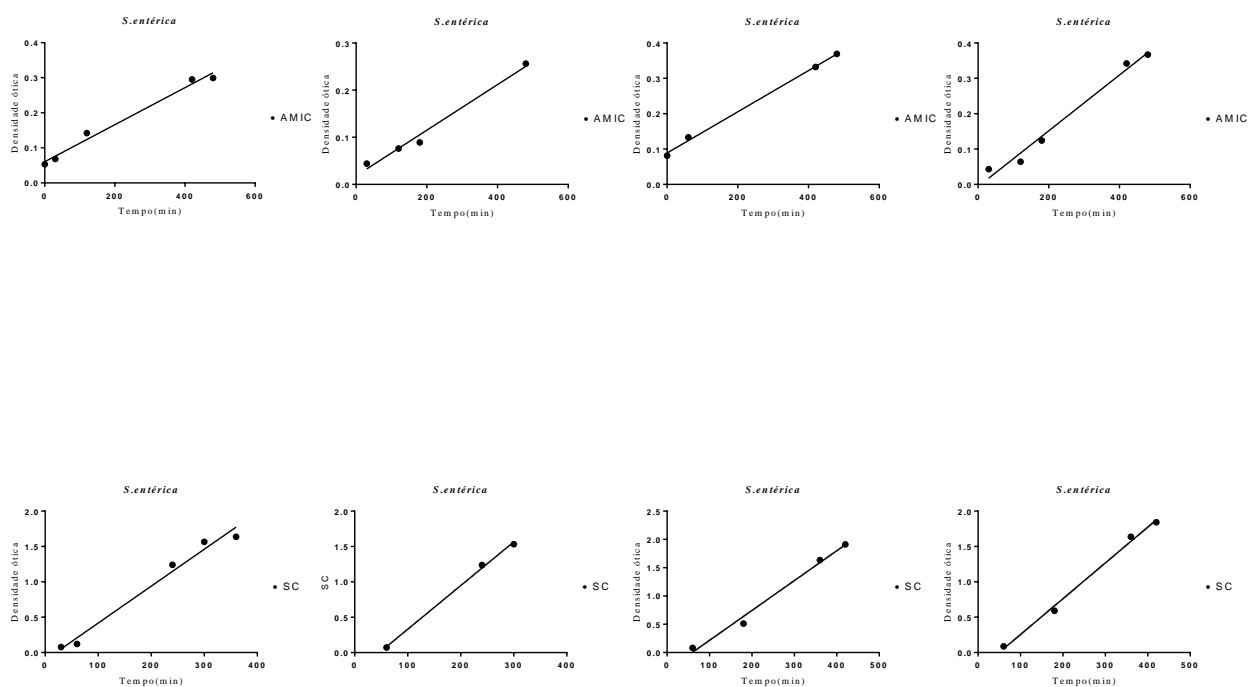
184. Margittai E, Sitia R. Oxidative protein folding in the secretory pathway and redox signaling across compartments and cells. *Traffic*. 2011;12(1):1-8. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01108.x.
185. Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol*. 2014;5(August):196. doi:10.3389/fphar.2014.00196.
186. Brewer MS. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2011;10(4):221-247. doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x.
187. Engin KN. Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant. *Mol Vis*. 2009;15:855-60.
188. Kumar A, Kaur H, Devi P, Mohan V. Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome. *Pharmacol Ther*. 2009;124(3):259-68. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.07.003.
189. Nijveldt R, Nood E, Hoorn D, Boelens P, Norren P LP. Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and. *Am J Clin Nutr*. 2001;74:418-425.
190. Pieczyńska J, Grajeta H. The role of selenium in human conception and pregnancy. *J Trace Elem Med Biol*. 2014. doi:10.1016/j.jtemb.2014.07.003.
191. La Carbona S, Sauvageot N, Giard J-C, et al. Comparative study of the physiological roles of three peroxidases (NADH peroxidase, Alkyl hydroperoxide reductase and Thiol peroxidase) in oxidative stress response, survival inside macrophages and virulence of *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol*. 2007;66(5):1148-63. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05987.x.
192. Garsin DA, Frank KL, Ausubel FM, Hartke A, Shankar N, Murray BE. Pathogenesis and Models of Enterococcal Infection. *Enterococci From Commensals to Lead Causes Drug Resist Infect*. 2014:1-41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190426/>.
193. Verneuil N, Mazé A, Sanguinetti M, et al. Implication of (Mn)superoxide dismutase of *Enterococcus faecalis* in oxidative stress responses and survival inside macrophages. *Microbiology*. 2006;152(Pt 9):2579-89. doi:10.1099/mic.0.28922-0.
194. Huycke MM, Moore D, Joyce W, et al. Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* requires demethylmenaquinone and is attenuated by functional terminal quinol oxidases. *Mol Microbiol*. 2001;42(3):729-40.
195. Flahaut S, Laplace JM, Frère J, Auffray Y. The oxidative stress response in *Enterococcus faecalis*: relationship between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress proteins. *Lett Appl Microbiol*. 1998;26(4):259-64.
196. Ramsey M, Hartke A, Huycke M. The Physiology and Metabolism of Enterococci. 2002:1-43.
197. Wang J-H, Singh R, Benoit M, et al. Sigma S-dependent antioxidant defense protects stationary phase *Escherichia coli* against the bactericidal antibiotic gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;(July). doi:10.1128/AAC.03683-14.
198. Kohanski M a, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence C a, Collins JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*. 2007;130(5):797-810. doi:10.1016/j.cell.2007.06.049.
199. Poole K. Bacterial Multidrug Efflux Pumps Serve Other Functions. 2008;3(4):179-185.
200. Ingle R, Wadher S. International Journal of Pharmaceutical Chemistry Synthetic Development of Antimicrobial Novel Quinoxaline Derivatives. *Int J Pharm Chem*. 2014;4:1-5. doi:10.7439/ijpc.

201. Vieira M. Monitoring antibiotics in the environment . Study of Quinoxaline derivatives bioactivity. 2013;298. Available at: <http://run.unl.pt/handle/10362/11350>.
202. Francis J, Landquist J, Levi A, Silk J TJ. 2-Hydroxymethyl-3-methylquinoxaline 1:4-Dioxide: a Metabolite of 2:3-Dimethylquinoxaline 1:4-Dioxide Active against Gram-negative Bacteria. 1955;63(12811):455-457.
203. Tandon VK, Yadav DB, Maurya HK, Chaturvedi AK, Shukla PK. Design, synthesis, and biological evaluation of 1,2,3-trisubstituted-1,4-dihydrobenzo[g]quinoxaline-5,10-diones and related compounds as antifungal and antibacterial agents. *Bioorg Med Chem*. 2006;14(17):6120-6. doi:10.1016/j.bmc.2006.04.029.
204. Jadhavar PS, Kumar D, Purohit P, et al. Sustainable Approaches Towards the Synthesis of Quinoxalines. Ameta KL, Dandia A, eds. *Springer*. 2014. doi:10.1007/978-81-322-1850-0.
205. Khan SA, Asiri AM. Synthesis of novel steroidal oxazolo quinoxaline as antibacterial agents. *Arab J Chem*. 2011;4(3):349-354. doi:10.1016/j.arabjc.2010.06.058.
206. Socha AM, Laplante KL, Russell DJ, Rowley DC. Structure-activity studies of echinomycin antibiotics against drug-resistant and biofilm-forming *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009;19(5):1504-7. doi:10.1016/j.bmcl.2009.01.010.
207. Kumar A, Verma A, Chawla G, Studies V, Hamdard J, Delhi N. Synthesis , Antiinflammatory and Antimicrobial Activities of New Hydrazone and Quinoxaline derivatives. *Int J ChemTech*. 2009;1(4):1177-1181.
208. Reddy BJ, Reddy MCS. Synthesis , Characterization and Antibacterial Evaluation of Few 2,3-Substituted Quinoxalines. *J Chil Chem Soc*. 2010;55(4):9-11.
209. Moreno-viguri E, Pérez-silanes S. Quinoxaline 1,4-di- N -oxide Derivatives : Interest in the Treatment of Chagas Disease. *Rev Virtual Quim*. 2013;5(6):1101-1119.
210. Ramalingam P, Ganapaty S, Rao CB. In vitro antitubercular and antimicrobial activities of 1-substituted quinoxaline-2,3(1H,4H)-diones. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010;20(1):406-8. doi:10.1016/j.bmcl.2009.10.026.
211. Kotharkar S a, Shinde DB. Synthesis of antimicrobial 2,9,10-trisubstituted-6-oxo-7,12-dihydro-chromeno[3,4-b]quinoxalines. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16(24):6181-4. doi:10.1016/j.bmcl.2006.09.040.
212. Refaat HM, Moneer A a, Khalil OM. Synthesis and antimicrobial activity of certain novel quinoxalines. *Arch Pharm Res*. 2004;27(11):1093-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15595408>.
213. Wikler M et al. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Seventeenth Informational Supplement. *Clin Lab Stand Inst*. 2007;27(1).
214. Vickers A a, Chopra I, O'Neill AJ. Intrinsic novobiocin resistance in *Staphylococcus saprophyticus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(12):4484-5. doi:10.1128/AAC.00708-07.
215. Guo W, Hao H, Dai M, et al. Development of quinoxaline 1, 4-dioxides resistance in *Escherichia coli* and molecular change under resistance selection. *PLoS One*. 2012;7(8):e43322. doi:10.1371/journal.pone.0043322.
216. Luz IDS, Gomes Neto NJ, Tavares AG, Nunes PC, Magnani M, de Souza EL. Evidence for lack of acquisition of tolerance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 after exposure to

- subinhibitory amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(14):5021-4. doi:10.1128/AEM.00605-12.
217. Greenacre EJ, Lucchini S, Hinton JCD, Brocklehurst TF. The lactic acid-induced acid tolerance response in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium induces sensitivity to hydrogen peroxide. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(8):5623-5. doi:10.1128/AEM.00538-06.
218. Monack DM. *Helicobacter* and *salmonella* persistent infection strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(12):a010348. doi:10.1101/cshperspect.a010348.
219. Condell O, Sheridan Á, Power K a, et al. Comparative proteomic analysis of *Salmonella* tolerance to the biocide active agent triclosan. *J Proteomics.* 2012;75(14):4505-19. doi:10.1016/j.jprot.2012.04.044.
220. Lushchak VI. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2011;153(2):175-90. doi:10.1016/j.cbpc.2010.10.004.
221. Fahey R, Sundquist A. Evolution of glutathione metabolism. In: *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* Vol 64.; 1991:1-53.

## Apêndice 1

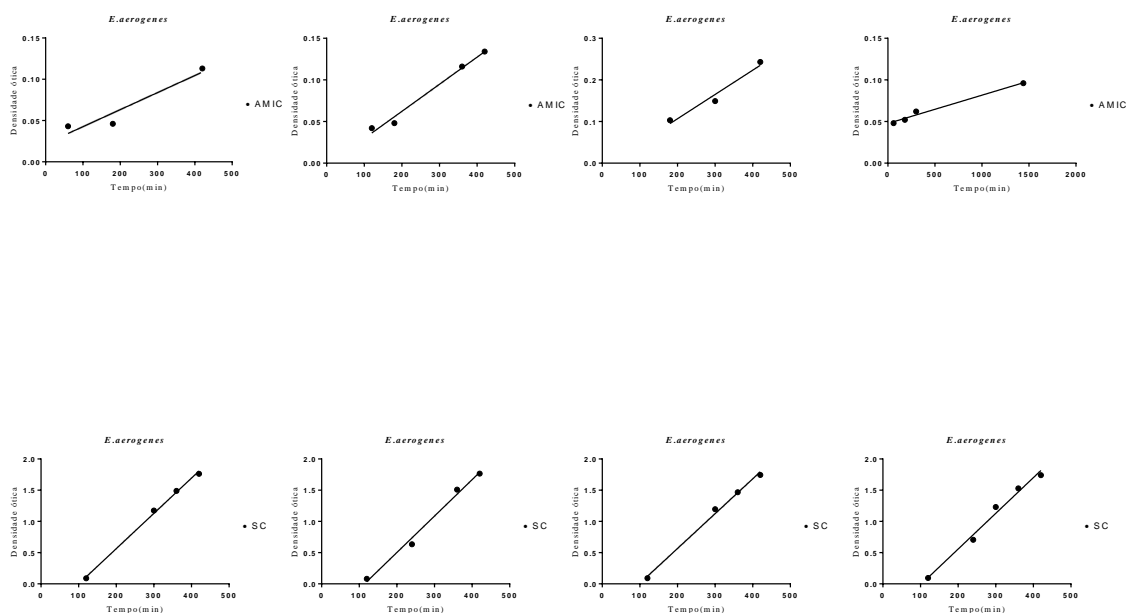
### 1.1 Declives das curvas de crescimento sem composto (SC) e com concentração inferior a CMI (AMIC) para o composto QNX, na *S. enterica*.



#### 1.1.1. Comparação dos valores medianos, da *S. enterica*, na presença e ausência do composto QNX.

	Ensaio1 ( $\bar{x}$ )	Ensaio2 ( $\bar{x}$ )	Ensaio3 ( $\bar{x}$ )	Ensaio4 ( $\bar{x}$ )	$\tilde{x}$	Intervalos de confiança (95%)	Valor $p^*$
SC	0,00522	0,006173	0,005282	0,005063	0,005251	0,004637-0,006232	0,029
ACMI	0,000528	0,000484	0,000583	0,000789	0,000556	0,000381-0,000811	

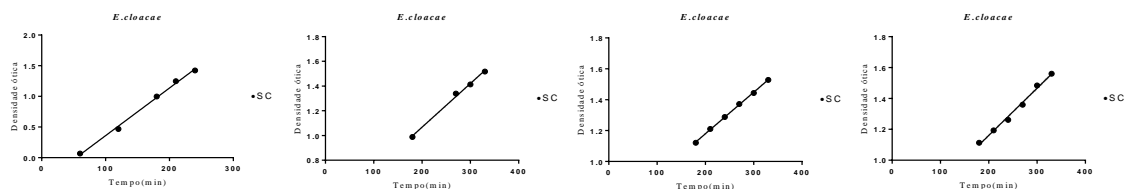
## 1.2 Declives das curvas de crescimento sem composto (SC) e com concentração inferior a CMI (AMIC) para o composto QNX, na *E. aerogenes*.

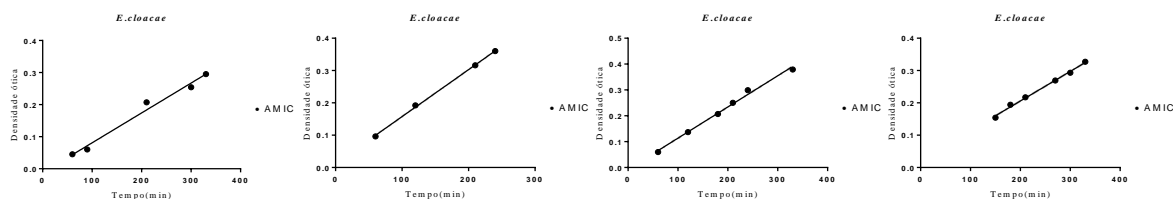


### 1.2.1. Comparação dos valores medianos, da *E. aerogenes*, na presença e ausência do composto QNX.

	Ensaio1 ( $\bar{x}$ )	Ensaio2 ( $\bar{x}$ )	Ensaio3 ( $\bar{x}$ )	Ensaio4 ( $\bar{x}$ )	$\tilde{x}$	Intervalos de confiança (95%)	Valor $p^*$
SC	0,00565	0,005833	0,005579	0,00572	0,005685	0,005523- 0,005868	0,029
ACMI	0,000207	0,000326	0,000583	3,39E- 05	0,000266	-0,000080- 0,000655	
*Mann-Whitney							

## 1.3 Declives das curvas de crescimento sem composto (SC) e com concentração inferior a CMI (AMIC) para o composto QNX, na *E. cloacae*.

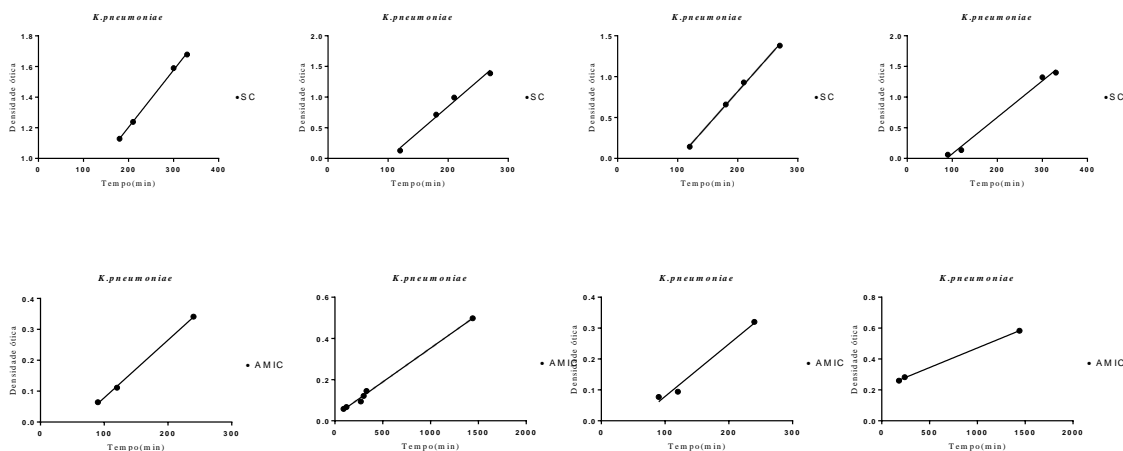




1.3.1. Comparação dos valores medianos, da *E.cloacae*, na presença (ACMI) e ausência (SC) do composto QNX.

	Ensaio1 ( $\bar{x}$ )	Ensaio2 ( $\bar{x}$ )	Ensaio3 ( $\bar{x}$ )	Ensaio4 ( $\bar{x}$ )	$\tilde{x}$	Intervalos de confiança (95%)	Valor $p^*$
SC	0,007767	0,003531	0,002684	0,003053	0,003292	0,000496-0,008021	0,029
ACMI	0,000931	0,001452	0,001206	0,000916	0,001069	0,000721-0,001532	

1.4 Declives das curvas de crescimento sem composto (SC) e com concentração inferior a CMI (AMIC) para o composto QNX, na *K. pneumoniae*.

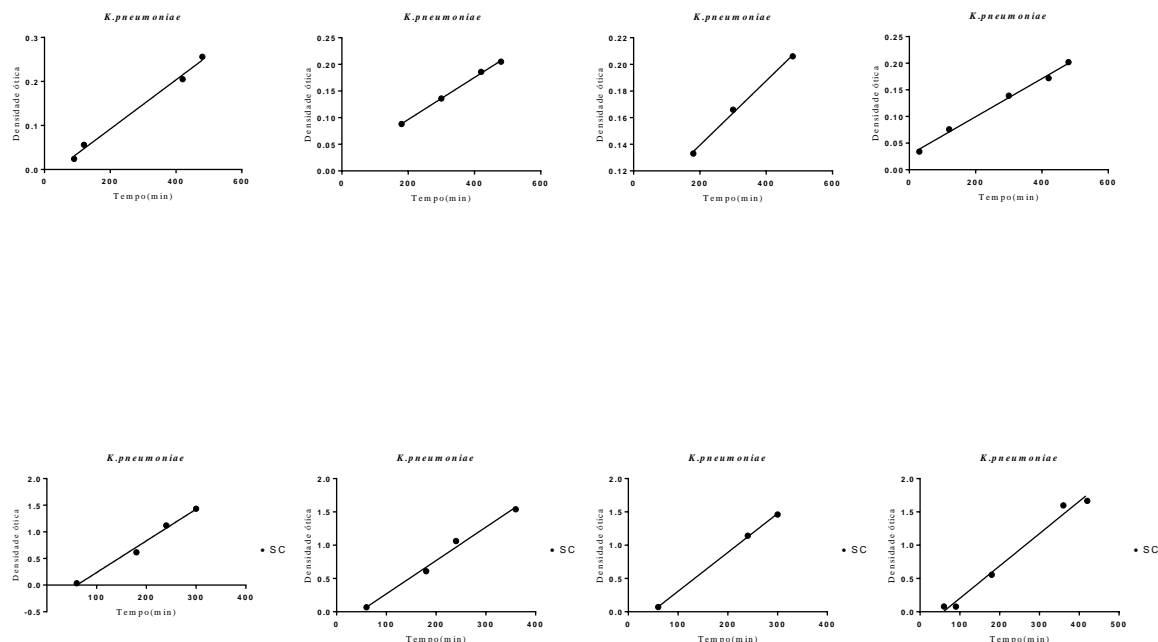


1.4.1. Comparação dos valores medianos, da *K.pneumoniae*, na presença (ACMI) e ausência (SC) do composto QNX.

	Ensaio1 ( $\bar{x}$ )	Ensaio2 ( $\bar{x}$ )	Ensaio3 ( $\bar{x}$ )	Ensaio4 ( $\bar{x}$ )	$\tilde{x}$	Intervalos de confiança (95%)	Valor $p^*$
SC (x)	0,003728	0,008432	0,008276	0,005945	0,007111	0,003056-0,010135	0,029
ACMI(x)	0,001867	0,000329	0,001695	0,000254	0,001012	-0,000338-0,002410	



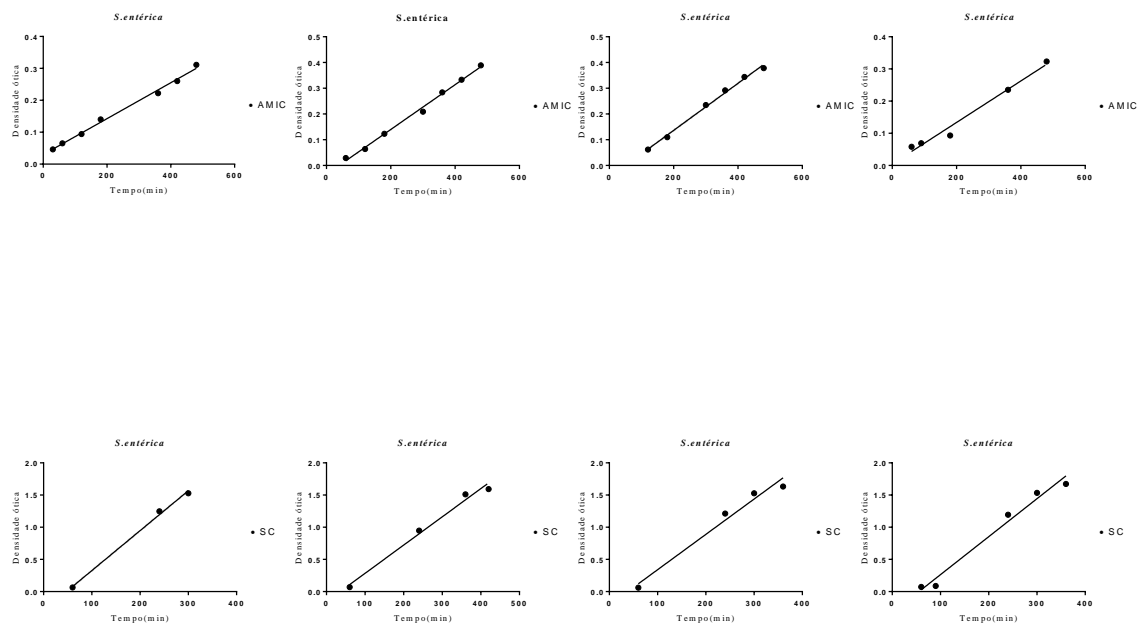
2.1. Declives das curvas de crescimento sem composto (SC) e com concentração inferior a CMI (AMIC) para o composto 2MQNX, na *K. pneumoniae*.



2.1.1. Comparação dos valores medianos, da *K.pneumoniae*, na presença (ACMI) e ausência (SC) do composto 2MQNX

	Ensaio1 ( $\bar{x}$ )	Ensaio2 ( $\bar{x}$ )	Ensaio3 ( $\bar{x}$ )	Ensaio4 ( $\bar{x}$ )	$\tilde{x}$	Intervalos de confiança (95%)	Valor $p^*$
SC	0,005945	0,005006	0,005834	0,004861	0,005420	0,004525-0,006298	0,029
ACMI	0,000559	0,000395	0,000242	0,000358	0,000377	0,000180-0,000597	

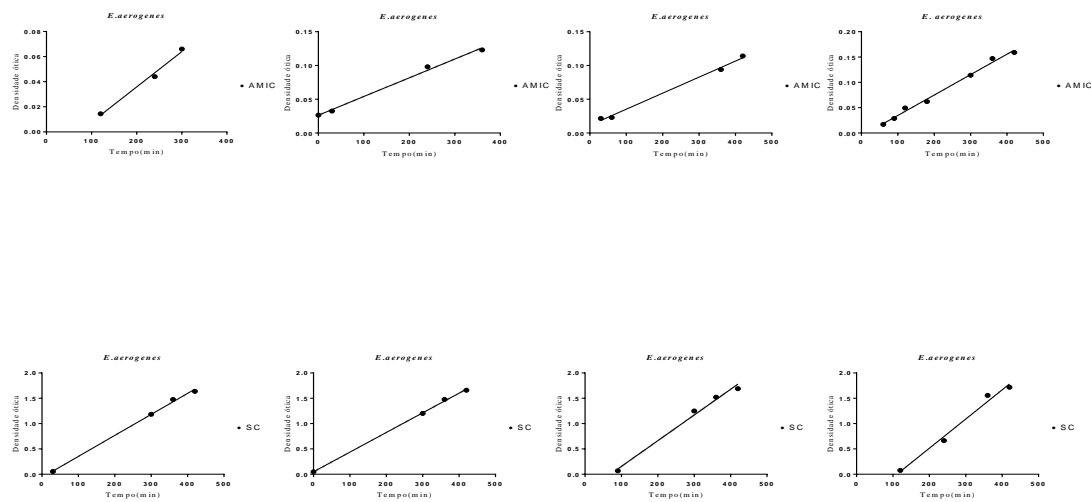
2.2. Declives das curvas de crescimento sem composto (SC) e com concentração inferior a CMI (AMIC) para o composto 2MQNX, na *S. enterica*.



2.2.1. Comparação dos valores medianos, da *S. enterica*, na presença (ACMI) e ausência (SC) do composto 2MQNX

	Ensaio1 ( $\bar{x}$ )	Ensaio2 ( $\bar{x}$ )	Ensaio3 ( $\bar{x}$ )	Ensaio4 ( $\bar{x}$ )	$\tilde{x}$	Intervalos de confiança (95%)	Valor $p^*$
SC	0,004146	0,00388	0,005074	0,005764	0,004610	0,003338-0,006094	0,029
ACMI	0,000281	0,000278	0,000238	0,000403	0,000279	0,000186-0,000414	

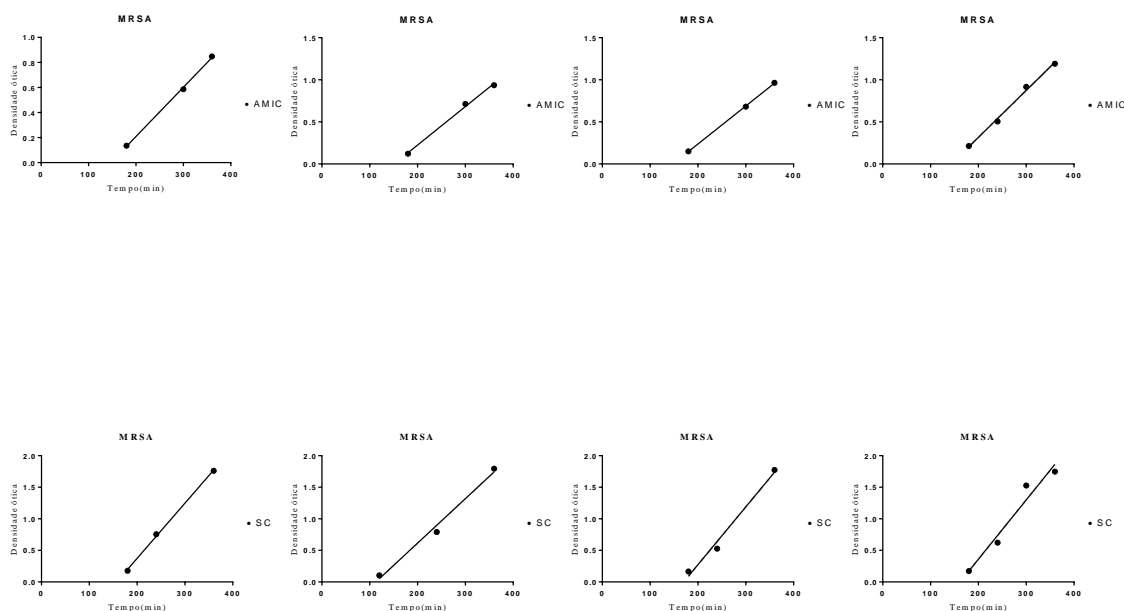
2.3. Declives das curvas de crescimento sem composto (SC) e com concentração inferior a CMI (AMIC) para o composto 2MQNX, na *E. aerogenes*.



### 2.3.1. Comparação dos valores medianos, da *S. enterica*, na presença (ACMI) e ausência (SC) do composto 2MQNX

	Ensaio1 ( $\bar{x}$ )	Ensaio2 ( $\bar{x}$ )	Ensaio3 ( $\bar{x}$ )	Ensaio4 ( $\bar{x}$ )	$\tilde{x}$	Intervalos de confiança (95%)	Valor $p^*$
<b>SC</b>	0,006204	0,00439	0,005488	0,0059	0,014750	0,01105563- 0,017219	0,029
<b>ACMI</b>	0,000563	0,00087	0,000914	0,000645	0,000760	0,000505-0,000982	

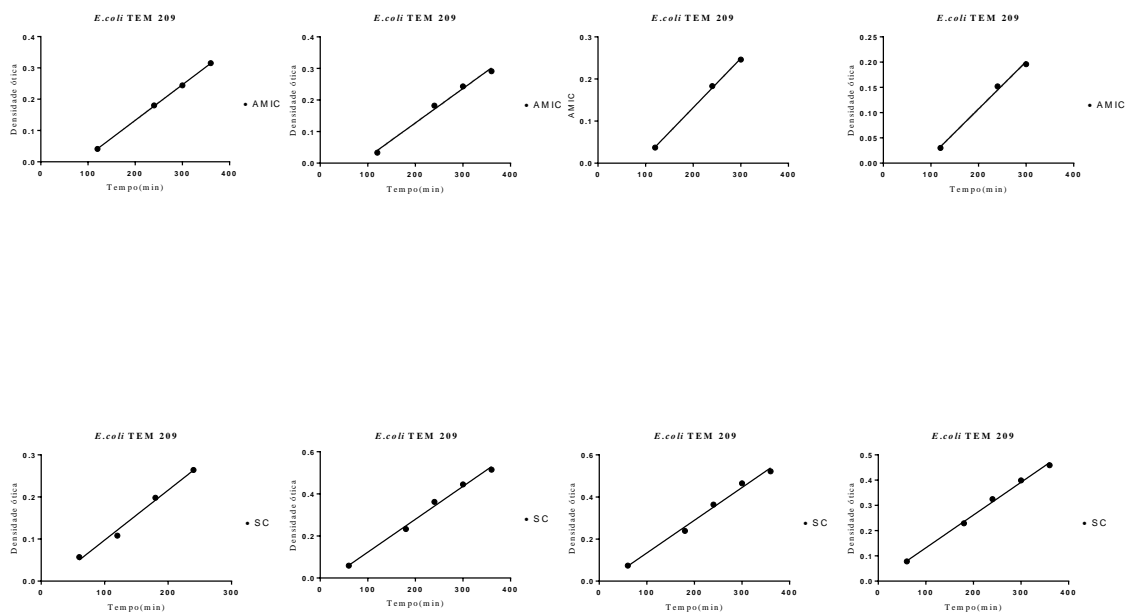
### 2.4. Declives das curvas de crescimento sem composto (SC) e com concentração inferior a CMI (AMIC) para o composto 2MQNX, na MRSA.



### 2.4.1 Comparação dos valores medianos, da MRSA, na presença (ACMI) e ausência (SC) do composto 2MQNX.

		Ensaio1 ( $\bar{x}$ )	Ensaio2 ( $\bar{x}$ )	Ensaio3 ( $\bar{x}$ )	$\tilde{x}$	Intervalos de confiança (95%)	Valor $p^*$
SC	0,008739	0,007046	0,009148	0,00939	0,008944	0,006897-0,010264	0,029
ACMI	0,003932	0,004575	0,004514	0,005577	0,004544	0,003563-0,005736	

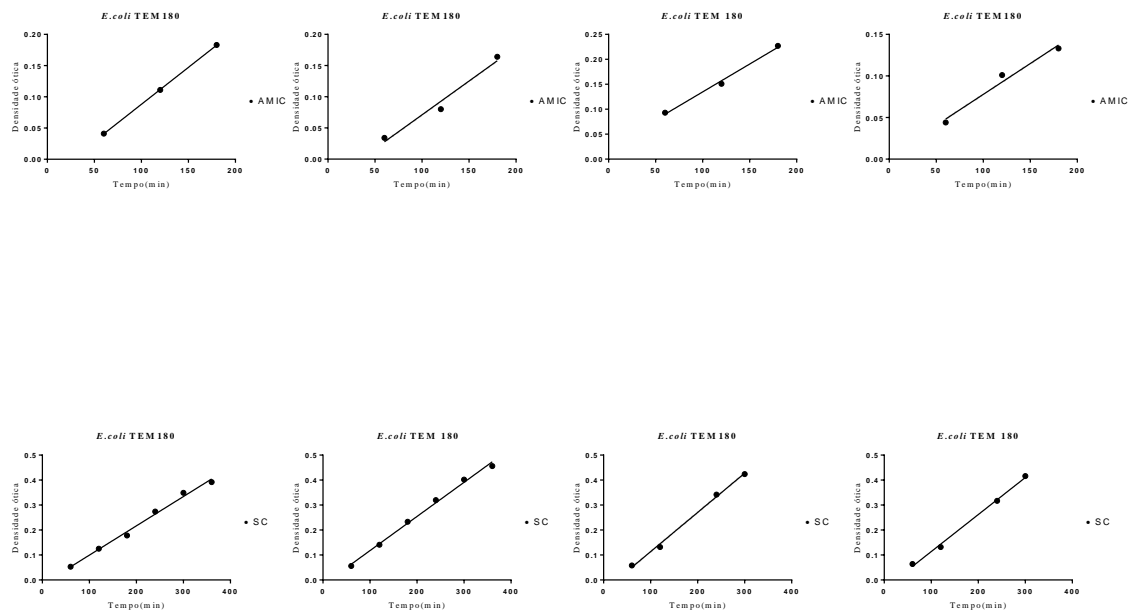
### 2.5. Declives das curvas de crescimento sem composto (SC) e com concentração inferior a CMI (AMIC) para o composto 2MQNX, na *E. coli* TEM 201.



2.5.1 Comparação dos valores medianos, da *E. coli* TEM 201, na presença (ACMI) e ausência (SC) do composto 2MQNX.

	Ensaio1 ( $\bar{x}$ )	Ensaio2 ( $\bar{x}$ )	Ensaio3 ( $\bar{x}$ )	Ensaio4 ( $\bar{x}$ )	$\tilde{x}$	Intervalos de confiança (95%)	Valor $p^*$
SC	0,001185	0,001563	0,001555	0,001297	0,001426	0,001099-0,001701	0,029
ACMI	0,001137	0,001089	0,001169	0,0009357	0,001113	0,000918-0,001247	

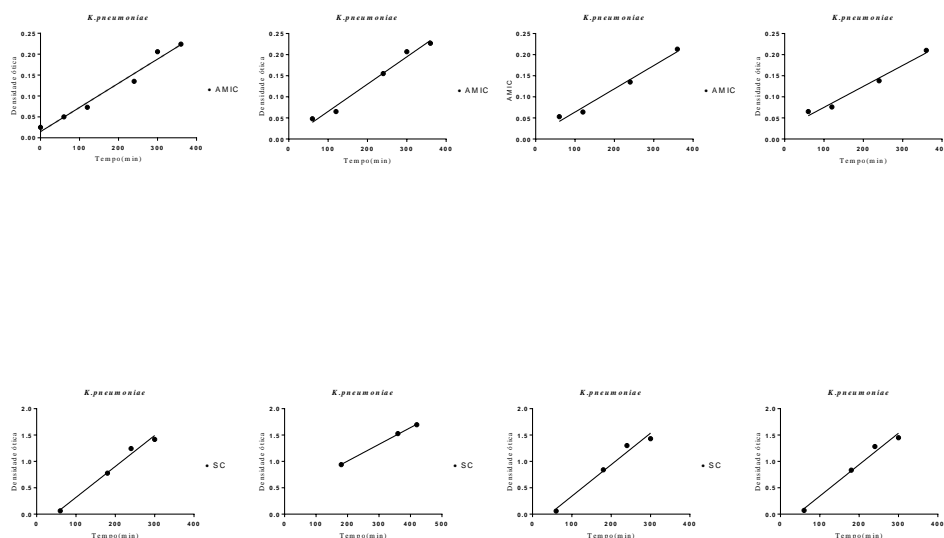
2.6. Declives das curvas de crescimento sem composto (SC) e com concentração inferior a CMI (AMIC) para o composto 2MQNX, na *E. coli* TEM 180.



2.6.1 Comparação dos valores medianos, da *E. coli* TEM 180, na presença (ACMI) e ausência (SC) do composto 2MQNX.

	Ensaio1 ( $\bar{x}$ )	Ensaio2 ( $\bar{x}$ )	Ensaio3 ( $\bar{x}$ )	Ensaio4 ( $\bar{x}$ )	$\tilde{x}$	Intervalos de confiança (95%)	Valor $p^*$
SC	0,001173	0,001367	0,00157	0,001482	0,001424	0,001125-0,001671	0,057
ACMI	0,001183	0,001117	0,0007417	0,001083	0,001100	0,000717	

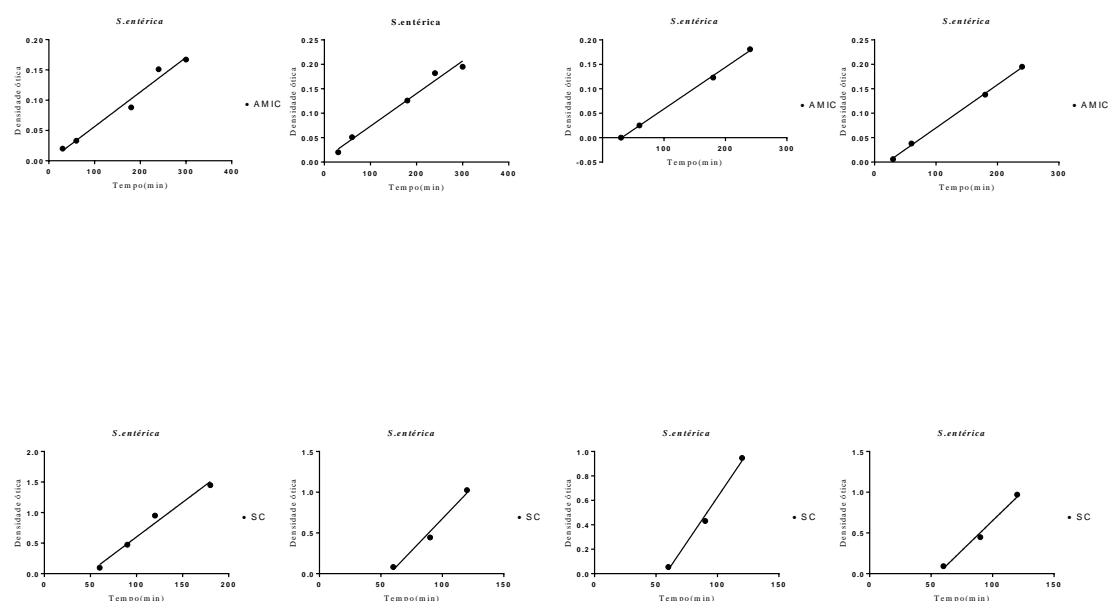
### 3.1. Declives das curvas de crescimento sem composto (SC) e com concentração inferior a CMI (AMIC) para o composto 2A3CQNX, na *K.pneumoniae*.



#### 3.1.1. Comparação dos valores medianos, da *K. pneumoniae*, na presença (ACMI) e ausência (SC) do composto 2A3CQNX.

	Ensaio1 ( $\bar{x}$ )	Ensaio2 ( $\bar{x}$ )	Ensaio3 ( $\bar{x}$ )	Ensaio1 ( $\bar{x}$ )	$\tilde{x}$	Intervalos de confiança (95%)	Valor $p^*$
SC	0,005868	0,003177	0,005971	0,00596	0,005914	0,003050-0,007438	0,29
ACMI	0,000578	0,000647	0,000551	0,000497	0,000565	0,000469-0,000668	

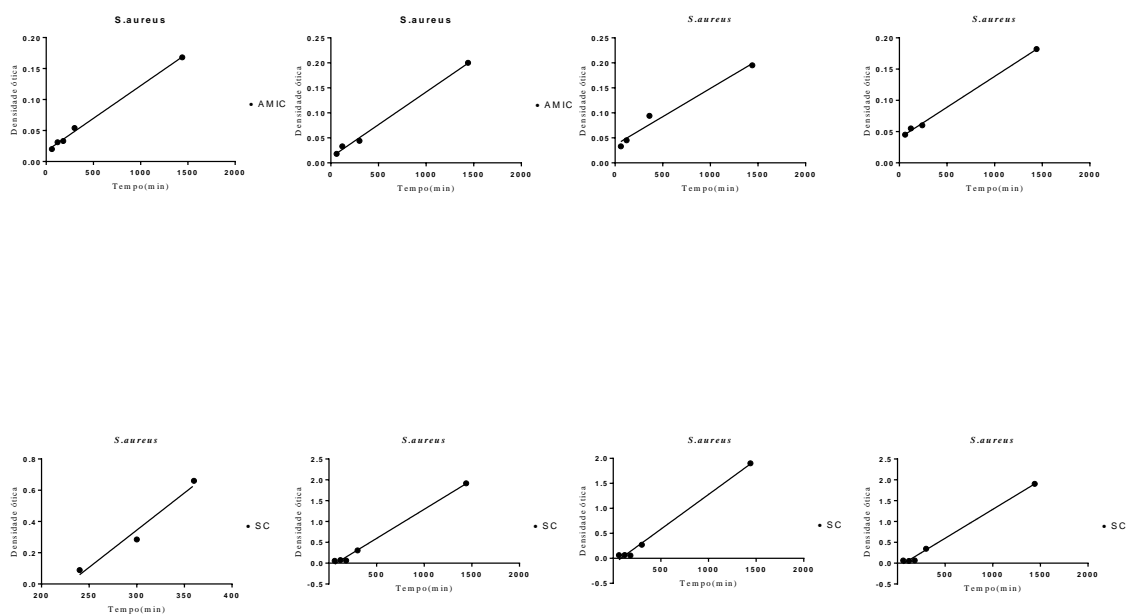
### 3.2. Declives das curvas de crescimento sem composto (SC) e com concentração inferior a CMI (AMIC) para o composto 2A3CQNX, na *S.enterica*.



3.2.1. Comparação dos valores medianos, da *S. enterica*, na presença (ACMI) e ausência (SC) do composto. 2A3CQNX.

	Ensaio1 ( $\bar{x}$ )	Ensaio2 ( $\bar{x}$ )	Ensaio3 ( $\bar{x}$ )	Ensaio1 ( $\bar{x}$ )	$\tilde{x}$	Intervalos de confiança (95%)	Valor $p^*$
SC	0,01132	0,01573	0,01487	0,01463	0,014750	0,011056-0,017219	0,029
ACMI	0,000571	0,000667	0,000853	0,000883	0,000760	0,000505-0,000982	

3.3. Declives das curvas de crescimento sem composto (SC) e com concentração inferior a CMI (AMIC) para o composto 2A3CQNX, na *S.aureus*.



3.3.1. Comparação dos valores medianos, da *S. enterica*, na presença (ACMI) e ausência (SC) do composto. 2A3CQNX.

	Ensaio1	Ensaio2	Ensaio3	Ensaio4	$\tilde{x}$	Intervalos de confiança (95%)	Valor $p^*$
SC	0,004758	0,001397	0,001388	0,001386	0,001392	-0,000447-0,004912	0,029
ACMI	0,000106	0,000131	0,000113	9,87E-05	0,000109	0,000090-0,000134	

2. Gráficos do rácio GSH/GSSG nas estirpes que obtiveram CMI, na primeira fase do estudo.

